

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR “SEVERO OCHOA”**

**RESPUESTA INMUNOREGULADORA Y SU RELACION CON LA  
INMUNOPATOLOGIA CARDIACA EN LA INFECCION POR *Trypanosoma cruzi*.**

**Socorro Cristina Sanoja Wasylkowski**

Madrid, 2010



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR “SEVERO OCHOA”**

**RESPUESTA INMUNOREGULADORA Y SU RELACION CON LA  
INMUNOPATOLOGIA CARDIACA EN LA INFECCION POR *Trypanosoma cruzi*.**

Memoria presentada para optar al título de Doctora en Biología Molecular por:

**Socorro Cristina Sanoja Wasylkowski**

Directores de Tesis:

**Manuel Fresno Escudero**

**Núria Gironès Pujol**





*A mi Andrea*



*La enfermedad de Chagas ha sido calificada como “plaga de los pobres e ignorantes”. La pobreza no es necesariamente un obstáculo para la vida higiénica. Hasta ahora la ignorancia, no la pobreza, es el mayor obstáculo para la lucha contra la enfermedad”*

*W. Petana, 1976*



## AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a la *Universidad Central de Venezuela* por haber financiado mis estudios de Doctorado en España. De igual manera a la *Universidad Autónoma de Madrid* por haberme permitido llevar a cabo y concluir el doctorado.

A mis directores de tesis *Manuel Fresno* y *Núria Gironès*, por su elevada calidad científica, académica y humana, quienes me acogieron en su laboratorio donde tuve la gran suerte de conocer el mundo de la inmunología molecular, para ellos mi eterna gratitud. A ti Nuria siempre colaboradora, consecuente, paciente y comprometida con el trabajo, muchas gracias.

Al personal técnico y de investigación del “*CBM/CX-103/226/SIDI/CNB*”, quienes participaron de manera desinteresada con su elevada formación profesional. Deseo agradecer especialmente a *Carlos Chillón*, por su ayuda técnica incondicional y sus sabios consejos en biología molecular. *Carmen Punzón*, siempre dispuesta y colaboradora, gracias por compartir conmigo y enseñarme tus destrezas y conocimientos en inmunología, excelente profesional. *María de los Angeles Chorro*, trabajadora incansable, que puedo decirte que no hayas leído ya en tantas tesis, la mística y el interés por el trabajo al que te comprometes son virtudes que escasean y quiero manifestar la alegría que me hace sentir el saber que aun existen personas como tú, gracias por todo María.

A mis compañeros y amigos del doctorado, los que estaban desde el comienzo y aún siguen allí, los que pasaron circunstancialmente y los que llegaron cuando ya era mi tiempo de regresar y siguen en la lucha diaria. Cada uno igual de importante por el aporte que me dieron para enriquecerme como profesional y/o como persona en algún momento de mi estadía en España. Son muchos y nombrarlos uno por uno sería dejar a alguien fuera, sin embargo, sí estas leyendo esta página tu eres una de esas personas, a ti gracias.

A *Magdalena Sanz* quien ha tenido que lidiar con tantos doctorandos de todas las razas, edades y religiones, pero siempre dispuesta a resolver nuestros problemas, gracias Mada.

A mi familia y amigos de Venezuela, a quienes deseo manifestar lo orgullosa que estoy por tener una familia y unos amigos como ustedes, quienes fueron mi sustento espiritual durante estos años con su ayuda incondicional en todo momento. En especial a *Andrea Atilano Sanoja*, *Bárbara Wasylkowski de Sanoja* y *Gilberto Payares*, tres personas maravillosas que me han hecho crecer y conocer lo bello de ser madre, hija y mujer.



## INDICE.

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xxi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xxv</b>
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	1
Agente etiológico.....	1
Vías de transmisión.....	2
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	3
Fases de la enfermedad de Chagas.....	4
Patogénesis.....	5
Patología chagásica.....	6
MECANISMOS EFECTORES Y REGULADORES EN LA INFECCION POR <i>T. cruzi</i> .....	8
Células efectoras.....	8
Células T reguladoras.....	10
Células Th17.....	16
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>21</b>
1. MATERIALES.....	21
1.1. Animales de experimentación.....	21
1.2. Anticuerpos y reactivos.....	22
1.2.1. Anticuerpos.....	22
1.2.2. Reactivos.....	23
1.3. Oligonucleótidos.....	24
1.3.1. Oligonucleótidos y sondas Taqman para PCR.....	24
2. METODOS.....	25
2.1. Modelos experimentales.....	25
2.2. Parasitemia y supervivencia de los ratones.....	26
2.3. Análisis histológico.....	27
2.4. Detección de ADN de <i>T. cruzi</i> en el tejido cardíaco mediante PCR Múltiplex y PCR cuantitativa a tiempo real.....	27

2.5.	Análisis de la transcripción génica (RT-PCR).....	28
2.6.	Cultivos primarios.....	28
2.7.	Cuantificación de citoquinas.....	29
2.8.	Aislamiento de células esplénicas, tímicas y PBMNCs.....	29
2.9.	Purificación de linfocitos T CD4+ presentes en el corazón de ratones infectados	30
2.10.	Obtención de infiltrado celular inflamatorio cardiaco CD4 <sup>+</sup> .....	31
2.11.	Citometría de flujo.....	31
2.12.	Ensayos de proliferación celular.....	31
2.13.	Análisis estadístico.....	32
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
1.	SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR <i>T. cruzi</i> .....	33
1.1.	Modelos de infección en ratones BALB/c susceptibles a <i>T. cruzi</i> .....	33
1.2.	Modelos de infección en ratones C57BL/6 menos susceptibles a <i>T. cruzi</i> .....	35
1.3.	Relación entre el inóculo de parásitos, susceptibilidad del hospedador, parasitemia y carga parasitaria cardiaca.....	36
1.4.	Nidos de amastigotes intracelulares en el tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 en la fase aguda de la infección.....	38
2.	RESPUESTA INMUNOLOGICA EN ORGANOS LINFOIDES DURANTE LA INFECCION AGUDA POR <i>T. cruzi</i> .....	39
2.1.	Citoquinas sistémicas durante la fase aguda de la infección.....	39
2.2.	Supresión de la producción de citoquinas en bazo de ratones infectados en fase aguda.....	42
2.3.	Estudio inmunológico del timo.....	46
2.3.1.	Atrofia tímica severa en respuesta a la infección por <i>T. cruzi</i> .....	47
2.3.2.	Incremento de células T reguladoras naturales en el timo de ratones C57BL/6 con la infección.....	49
3.	INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA EN CORAZON DURANTE LA EVOLUCION DE LA FASE AGUDA.....	53
3.1.	Mayor infiltración celular inflamatoria cardiaca en ratones menos susceptibles C57BL/6.....	53



3.2. Mayor inducción de la expresión de citoquinas Th1 en corazón de ratones C57BL/6.....	56
4. RESPUESTA INMUNE REGULADORA EN CORAZON DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i> .....	58
4.1. Mayor expresión génica de células T reguladoras en tejido cardiaco de ratones C57BL/6. ....	59
4.2. Detección de células T reguladoras en el infiltrado inflamatorio cardiaco.....	61
4.3. Detección de otras poblaciones celulares en el infiltrado inflamatorio cardiaco....	63
4.4. Supresión de la proliferación de esplenocitos por células T CD4+ de corazón de ratones C57BL/6.....	64
4.5. Balance de las respuestas T reguladora y Th17 en el infiltrado leucocitario de corazón.....	65
5. IMPORTANCIA DE LA SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDADOR EN LA EVOLUCION DE LA FASE CRONICA.....	68
<b>V. DISCUSION</b> .....	79
1. EFECTO DEL INOCULO DE PARASITOS Y LA SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDADOR EN LA PARASITEMIA Y LA CARGA PARASITARIA EN TEJIDO CARDIACO.....	79
2. DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LOS DIFERENTES MODELOS DE INFECCION.....	80
3. INFILTRACION LEUCOCITARIA CARDIACA.....	84
4. EFECTO DE LA RESPUESTA REGULADORA EN C57BL/6 DURANTE LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN.....	86
5. DESARROLLO DE LA INMUNOPATOLOGIA DURANTE LA FASE CRONICA.....	90
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	93
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	95
<b>APENDICES</b> .....	105



## INDICE DE FIGURAS.

Figura I. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas.....	2
Figura II. Principales estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
Figura III. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Figura IV. Fases de la enfermedad de Chagas en el ser humano.....	5
Figura V. Diferenciación de las células Th.....	8
Figura VI. Desarrollo e interrelación de los subconjuntos de células T reguladoras. ....	12
Figura VII. Papel beneficioso ó perjudicial de la respuesta inmune reguladora durante infecciones parasitarias.....	14
Figura VIII. Diferenciación de las células Th17 a partir de células T CD4 vírgenes.....	17
Figura 1. Evolución de la parasitemia y supervivencia en ratones BALB/c infectados con diferentes inóculos de <i>T. cruzi</i> .....	34
Figura 2. Evolución de la parasitemia y supervivencia en ratones C57BL/6 infectados con diferentes inóculos de <i>T. cruzi</i> .....	35
Figura 3. Comparación de la evolución de la parasitemia en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con el inóculo bajo (50 par/ratón).....	36
Figura 4. Invasión de <i>T. cruzi</i> en el tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 durante la fase aguda de la infección.....	38
Figura 5. Estudio histológico de cortes de tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con inóculo 2.000 par/ratón de <i>T. cruzi</i> , en fase aguda (día 12 p.i.) .....	39
Figura 6. Niveles de citoquinas Th1/Th2 en suero de ratones infectados, evaluados durante la fase aguda. ....	42
Figura 7. Poblaciones leucocitarias presentes en bazo de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 2.000 parásitos analizados mediante citometría de flujo.....	44
Figura 8. Producción <i>in vitro</i> de citoquinas Th1/Th2/Th17 por células T de bazo de ratones BALB/c en fase aguda, infectados con el inóculo alto.....	45

Figura 9. Producción <i>in vitro</i> de citoquinas Th1/Th2/Th17 por células T de bazo de ratones C57BL/6 en fase aguda, infectados con el inóculo al.....	46
Figura 10. Número total de células por timo de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 50 y 2.000 tripomastigotes, durante los días 12 y 17 de la fase aguda.....	47
Figura 11. Análisis mediante citometría de flujo de los tipos de linfocitos TCD4 y TCD8 presentes en el timo de ratones infectados en fase aguda.....	48
Figura 12. Número de células T CD4 <sup>+</sup> simple positiva por timo de ratones BALB/c y C57BL/6.....	49
Figura 13. Subpoblaciones celulares asociadas a los linfocitos T reguladores en el timo de ratones BALB/c inoculados con 2.000 parásitos, en fase aguda.....	50
Figura 14. Evaluación de las poblaciones celulares asociadas a los linfocitos T reguladores en el timo de ratones C57BL/6 inoculados con 2.000 parásitos, en fase aguda.....	51
Figura 15. Número de células T reg en el timo de ratones infectados con 2.000 parásitos.	52
Figura 16. Subpoblaciones de células T reg en el timo de ratones C57BL/6 inoculados con 50 parásitos analizados mediante citometría de flujo.....	53
Figura 17. Infiltrado celular inflamatorio cardíaco en ratones infectados con <i>T. cruzi</i> .....	55
Figura 18. Expresión génica de citoquinas Th1 en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados con <i>T. cruzi</i> con los inóculos bajo y alto.....	57
Figura 19. Expresión de IL-6 en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados con inóculos bajo y alto de <i>T. cruzi</i> , 50 y 2.000 parásitos, respectivamente.....	58
Figura 20. Expresión de marcadores de células T reguladoras en el corazón de los ratones durante la infección aguda.....	61
Figura 21. Caracterización fenotípica de poblaciones de células T en corazón de ratones C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i> durante la fase aguda.....	63
Figura 22. Infiltrado celular inflamatorio de corazones de ratones C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i> .....	64
Figura 23. Actividad supresora de células T CD4 <sup>+</sup> purificadas del corazón de ratones infectados. ....	65

Figura 24. Expresión de citoquinas asociadas a las células T reguladoras naturales en el corazón de ratones infectados. ....	66
Figura 25. Expresión de citoquinas asociadas a la respuesta Th17 en corazón.....	67
Figura 26. Inducción de la expresión de factores de transcripción asociados a Th17.....	68
Figura 27. Estudio histológico de cortes de tejido cardíaco de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i> , en fase crónica (100 d.p.i.).....	69
Figura 28. Detección del ADN de <i>T. cruzi</i> en el tejido cardíaco de ratones infectados durante la fase crónica.....	70
Figura 29. Análisis mediante citometría de flujo de los tipos de linfocitos TCD4 y TCD8 presentes en el timo de ratones infectados en fase crónica.....	73
Figura 30. Infiltrado celular inflamatorio cardíaco en ratones infectados en fase crónica (100 d.p.i.). ....	74
Figura 31. Expresión de citoquinas Th1 en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados en fase crónica a los 100 d.p.i. ....	75
Figura 32. Expresión de marcadores de células T reguladoras y citoquinas anti-inflamatorias en el corazón de los ratones durante la infección crónica (100 d.p.i.).....	76
Figura i. Subpoblaciones celulares en el timo de ratones C57BL/6 inoculados con 50 parásitos, en fase aguda (17 d.p.i.).....	105



## INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones BALB/c, inóculo 50 parásitos/ratón, evaluación en fase aguda.....	40
Tabla 2. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6, inóculo 50 parásitos/ratón, evaluación en fase aguda.....	40
Tabla 3. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones. BALB/c, inóculo 2.000 parásitos/ratón, evaluación en fase aguda.....	41
Tabla 4. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6, inóculo 2.000 parásitos/ratón, evaluación en fase aguda.....	41
Tabla 5. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones BALB/c, inóculo 50 parásitos/ratón, evaluación en fase crónica.....	70
Tabla 6. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6, inóculo 50 parásitos/ratón, evaluación en fase crónica.....	71
Tabla 7. Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6, inóculo 2.000 parásitos/ratón, evaluación en fase crónica.....	72
Tabla 8. Expresión del ARNm de genes relacionados con la respuesta T reguladora en el corazón de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> en fase crónica (100 d.p.i.).....	76
Tabla 9. Expresión del ARNm de genes relacionados con la respuesta Th17 en corazón de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> en fase crónica (100 d.p.i.).....	77





## LISTA DE ABREVIATURAS.

Ac	Anticuerpo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APC	Aloficocianina/ Célula Presentadora de Antígeno
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
BSA	Sero Albúmina Bovina
c.p.m.	cuentas por minuto
Ca <sup>++</sup>	Calcio
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CCC	Cardiomiopatía Chagásica Crónica
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4
Cy5-PE	Cianina 5- Ficoeritrina
dNTPs	Desoxiribonucleótido trifosfato
DP	Doble Positivas
dpi	días post infección
DS	Desviación Estándar
EMS	Error Medio Estándar
FACS	Flow Cytometric Analysis and Sorting
FCS	Suero Fetal Bovino
Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FOXP3	Forkhead box P3
FR4	Folate Receptor 4
g	Gravedades
g/L	gramos/litro
GITR	Glucocorticoid-Induced (Tumor Necrosis Factor-Nerve Growth Factor) Receptor

GM-CSF	Factor Estimulador de la formación de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
H & E	Hematoxilina & Eosina
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IL	Interleuquina
IL-2R	Receptor de IL-2
iNOS	Sintetasa Inducible de Oxido Nítrico
IRF-4	Interferon Regulatory Factor
iTreg	T reguladoras inducidas
LAG-3	Lymphocyte Activation Gene-3
Mc	Monoclonal
Mg <sup>++</sup>	Magnesio
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NFAT	Factor Nuclear de Activación de Células T
NF $\kappa$ -B	Factor Nuclear $\kappa$ -B
ng	Nanogramos
NI	No Infectado
NK	Natural Killer
NKT	Células T Natural Killer
NO	Oxido Nítrico
N-PCR	Nested-PCR
Paraformaldehido	PFA
Parásitos/ratón	par/ratón
pb	pares de bases
PBMNC	Células Mononucleares Sanguíneas
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

pDC	Células dendríticas plasmacitoides
pi	post infección
PE	Ficoeritrina
qPCR	PCR cuantitativa a Tiempo Real
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa a Tiempo Real
ROR- $\gamma$ t	Retinoid Orphan Nuclear Receptor
RT	Transcriptasa Reversa
SFB	Suero Fetal Bovino
SP	Simple Positiva
STAT3	Signal Transducers and Activator of Transcription
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tc	<i>T cruzi</i>
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Th1	T cooperadora 1
Th2	T cooperadora 2
Th17	T cooperadora 17
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$
Tregs	T reguladoras
UI/ml	Unidades Internacionales/mililitro
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ m	Micrómetros



## SUMMARY

Chagas disease is caused by infection with the protozoan haemoflagellate *Trypanosoma cruzi* and there are 8 million infected people in Latin America. A feature of the acute phase of the infection is the proliferation of circulating and intracellular parasites; these can invade most of the tissues, mainly the cardiac fibers. Scarce number of parasites is found during the chronic phase and cardiac hypertrophy, flabby heart and other cardiomiopathies can be detected. However, some chagasic patients never develop clinical manifestation during the chronic phase. There is not a clear picture of the cellular and molecular characteristics of the pathogenesis of *T. cruzi* infection. Some authors have proposed that the cardiac chronic pathogenesis depends of a constant and very low systemic infection, associated with an adverse immune reaction, in such a way that the persistence of parasites and immunological mechanisms, closely related, are involved in the long term myocardial aggression. During the parasitic infection, the immune regulation can emerge as an attenuating effect of the host immune response against the parasite and/or could be actively induce by the parasite itself as a survival strategy. Our main objective was to determine the possible role of the T regulatory cells and Th17 in the modulation of the experimental Chagas pathology during the acute and chronic phase of infection. Different experimental models were established to evaluate the molecular and immunological events responsible by the cardiac pathogenesis in Chagas disease. As a result of this investigation, a high gen expression of inflammatory myeloid and lymphoid cellular populations (CD4, CD8, B220, CD68, CD11b and CD11c) and T cell regulatory markers (FOXP3, FR4, CTLA-4 and GITR) were detected in the cardiac tissue of the less susceptible C57BL/6 strain of mice, but not in the more susceptible BALB/c strain. These results were confirmed by a flow cytometry analysis of the cardiac inflammatory infiltrate. On the contrary, we have not found a clear Th17 response in our working models, suggesting that any association between Th17 cells and susceptibility to infection do not seem to exist. Our results also suggest that the regulatory T cells could play an immunosuppressor role during the acute phase of the disease but not in the chronic phase. This regulatory T cell response should be beneficial to the host, increasing the survival time of the mice, decreasing the circulating and cardiac parasitic load and controlling the inflammation of the target organ, the heart.



## I. INTRODUCCION.

### ENFERMEDAD DE CHAGAS.

#### Agente etiológico.

La enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Clase *Kinetoplastidea*, Orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*) (De Souza, 2000). La especie *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) está compuesta por subpoblaciones genéticamente diversificadas a partir de un clon originado en el orden *Kinetoplastida*. Con base a estudios de biología molecular se han descrito dos linajes filogenéticos ancestrales de *T. cruzi* que divergieron hace 10 a 40 millones de años. Así, los aislados de *T. cruzi* han sido clasificados genéticamente dentro de los linajes Tc (*T. cruzi*) I y TcII, asociándose predominantemente a los ciclos doméstico y selvático (TcI) y doméstico (TcII) (Miles y col., 1978; Vallejo y col., 2009). El grupo TcII fue clasificado en cinco subgrupos, denominados IIa al IIe, mientras que un tercer grupo ancestral TcIII ha sido recientemente caracterizado (Scharfstein y col., 2009). De tal manera que estos parásitos poseen variaciones en su fenotipo, tasas de multiplicación y tropismo tisular, así como diferentes susceptibilidades frente a drogas antiparasitarias.

La enfermedad de Chagas ha sido descrita como una dolencia crónica, debilitante e incapacitante, que se manifiesta con cuadros clínicos variados, en ocasiones muy severos y fatales. Se ha estimado que existen 8 millones de individuos infectados (Rassi y col., 2010) en 21 países endémicos del continente americano, desde el norte de México hasta el Sur de Argentina y Chile (WHO, 2005; Schmunis, 2007) y 28 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Fig. I). Constituye una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en Latinoamérica, donde permanece como un problema de salud pública, ocasionando 20.000 a 50.000 muertes al año (WHO 2002; TDR/SWG/09 2007) con una incidencia estimada de 300.000 nuevos casos por año (Gutiérrez y col., 2009).

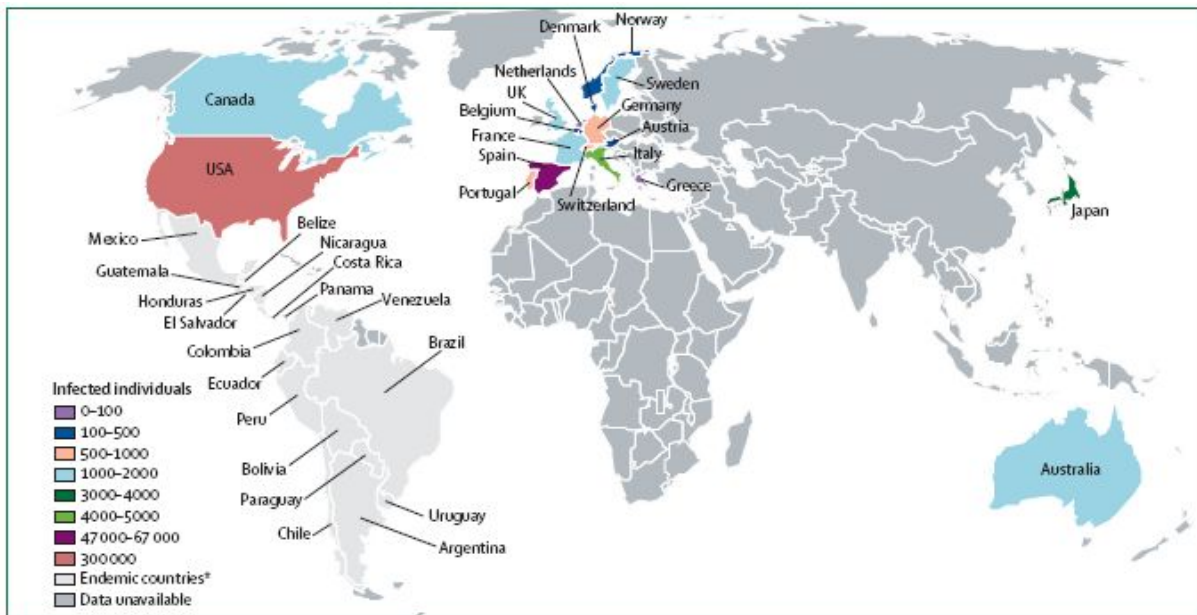


Figura I. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas. Tomado de Rassi y col. 2010.

### Vías de transmisión.

La transmisión vectorial constituye la principal y más importante vía de contagio de *T. cruzi* al ser humano. Otros modos de transmisión son las transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, la transmisión congénita por vía transplacentaria, demostrada en todas las fases de la enfermedad y la vía oral (Pinto, 2000; Bittencourt, 2000; Alarcón de Noya y col., 2010). Durante las últimas décadas, las dificultades económicas en los países endémicos han estimulado las migraciones desde las zonas rurales donde prevalece la infección hacia zonas urbanas, incrementando la probabilidad de contaminación en los centros de salud por transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos a partir de donadores infectados. Así mismo, debido a la migración hacia otros países, la contaminación transfusional por *T. cruzi* se ha ido convirtiendo en un problema potencial en países desarrollados tales como Estados Unidos, Canadá, países de Europa Occidental, Australia y Japón, constituyendo un factor de riesgo para la población (Schmunis, 2000; Gutierrez y col., 2009). A nivel mundial, España es el segundo país después de Estados Unidos con mayor número de inmigrantes provenientes de Latinoamérica (Pérez de Ayala y col., 2009) y el primero de Europa (Schmunis, 2007). En este sentido, entre los años 2003 y 2008, un total de 120 pacientes procedentes de zonas endémicas para *T. cruzi*, fueron diagnosticados como



enfermos chagásicos crónicos en el Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España), de los cuales 22,5% presentaron patología chagásica cardíaca (Pérez de Ayala, 2009). Así mismo, Gascón y col. (2009) reportaron un estimado de 47.743 a 67.423 personas infectadas con *T. cruzi* habitando en España. Carod-Artal & Gascon (2010) indicaron que en este país, la seroprevalencia en donantes de sangre provenientes de regiones endémicas fue 0,62%, con una elevada prevalencia (10,2%) en donantes oriundos de Bolivia. Igualmente, los autores describieron un estudio llevado a cabo en 1.350 mujeres latinoamericanas embarazadas, resultando 3,4% infectadas con *T. cruzi* y 7,3% de los niños nacidos de madres infectadas.

### Ciclo de vida de *T. cruzi*.

En su ciclo de vida, el parásito exhibe las formas epimastigote, tripomastigote, amastigote y otras formas de transición entre estas (Fig. II).

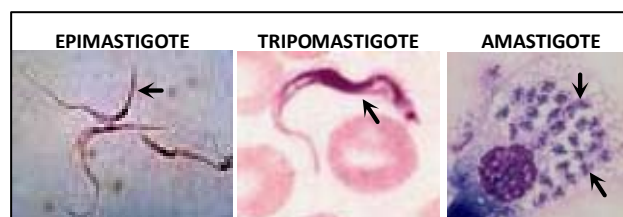


Figura II. Principales estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. epimastigote, tripomastigote y amastigote intracelular. La flecha señala el estadio morfológico.

En general, el ciclo de vida de *T. cruzi* consta de un hospedador invertebrado, el insecto vector (*Reduviidae*, *Triatominae*) y los hospedadores mamíferos, entre ellos el hombre. El triatomino contaminado aloja las formas infectantes del parásito (tripomastigotes metacíclicos) junto con las heces en la ampolla rectal. Para alimentarse, perfora la piel del hospedador con la probóscide, succiona la sangre, y al terminar defeca, depositando los tripomastigotes sobre la piel en las cercanías de la herida producida por la picadura. El flagelado ingresa al organismo a través de esta herida o de excoriaciones preexistentes en la piel o por la mucosa ocular u oral, e inmediatamente invade las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador. Tras penetrar la célula, el tripomastigote comienza su transformación perdiendo su aspecto alargado, el flagelo y la membrana ondulante y se redondea convirtiéndose en amastigote. Los amastigotes inician una multiplicación asexual por división binaria y después de varias generaciones regresan al estadio de tripomastigotes, rompen la membrana de la célula y son liberados a los espacios

intersticiales. Algunos de estos tripomastigotes sanguíneos pueden ser fagocitados por células vecinas, o bien diseminarse por el torrente sanguíneo y linfático e invadir los mas variados tipos de células, especialmente las fibras estriadas, tanto cardíacas como esqueléticas, las fibras lisas, células nerviosas y células del sistema fagocítico mononuclear. Otra posibilidad es la de ser ingeridos por el insecto durante su alimentación y continuar el ciclo de vida (Brener, 1992) (Fig. III).

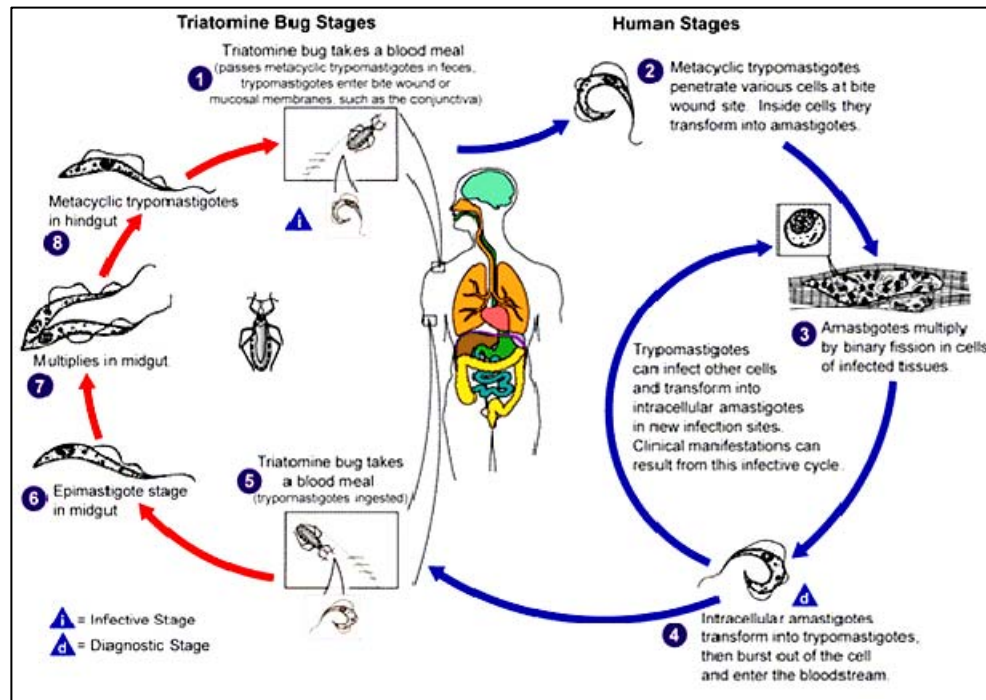


Figura III. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

### Fases de la enfermedad de Chagas.

En el ser humano, la enfermedad de Chagas presenta una fase aguda inicial de corta duración de uno a dos meses. La mayoría de los individuos exhiben síntomas parecidos a los de un resfriado común y miocarditis asintomática, pasando desapercibida. Sin embargo, durante esta etapa inicial, de 5 a 10% de las personas infectadas pueden presentar una intensa miocarditis acompañada de un elevado parasitismo sanguíneo y tisular, pudiendo desarrollar una miocarditis fulminante (Parada y col., 1997; Andrade, 1999; Texeira y col., 2006). En los supervivientes, esta fase inicial es seguida por una etapa crónica que comienza con un período latente o indeterminado, caracterizado por la ausencia de parásitos sanguíneos y donde la mayoría de los individuos permanece libre de cualquier síntoma

clínico (pacientes indeterminados). Diez a veinte años después durante la evolución de la fase crónica, alrededor del 30% de los pacientes infectados puede llegar a desarrollar una forma de cardiopatía conocida como Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) (Bilate & Cunha-Neto 2008) y/o dilataciones del tubo digestivo (megaesófago y megacolon) y desórdenes neurológicos debidos al daño tisular progresivo, ocasionándoles finalmente la muerte (WHO 2002) (Fig. IV).

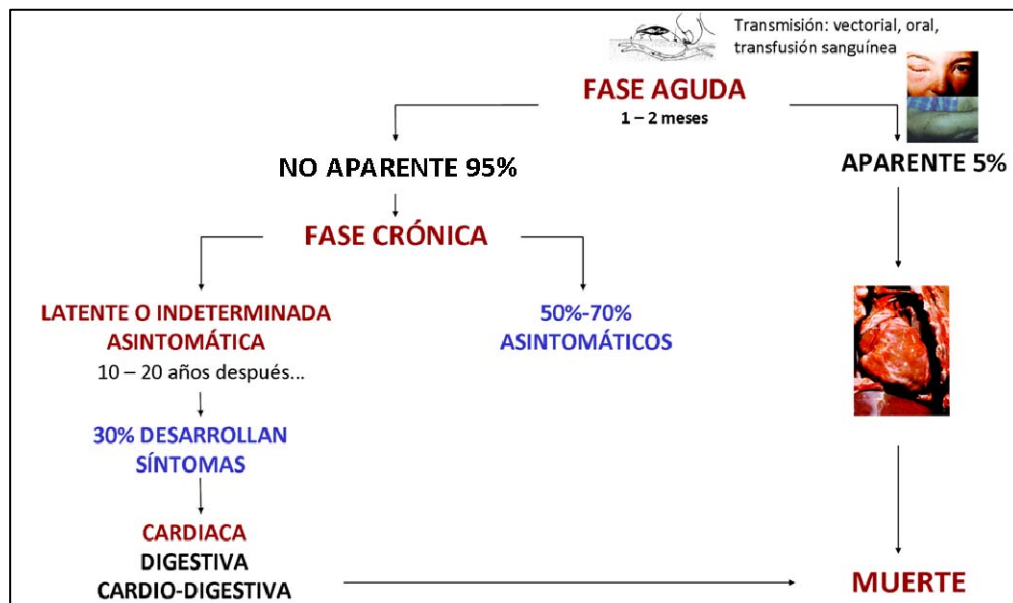


Figura IV. Fases de la enfermedad de Chagas en el ser humano.

### Patogénesis.

La asociación de los linajes de *T. cruzi* con las diferentes formas clínicas de la enfermedad ha sido ampliamente reportado. En este sentido, las cepas de *T. cruzi* pertenecientes al grupo TcI han sido relacionadas a la miocardiopatía chagásica crónica en Norte América y Centro América, mientras que los miembros del grupo TcII han sido asociadas a la enfermedad cardíaca en el Cono Sur de Sur América (Scharfstein y col., 2009). Estudios recientes realizados en seres humanos por Venegas y col., (2009) mostraron que en pacientes infectados con cepas de *T. cruzi* tipo TcIIb e híbridos de TcIIId y TcIIe, los parásitos fueron eliminados del tejido cardíaco debido a una fuerte respuesta inmunológica efectora. No obstante, esta eliminación indujo una inmunopatología colateral cardíaca, al menos en los pacientes que residían en el Cono Sur de Sur América, sugiriendo una relación entre el parásito y las características genéticas del hospedador.

Los conocimientos sobre los mecanismos responsables de la patogénesis de la enfermedad de Chagas permanecen limitados, fragmentados y son controvertidos (Kierszenbaum, 2007). Se ha propuesto que la patogénesis de la enfermedad de Chagas cardíaca crónica es dependiente de una infección sistémica en un grado bajo pero constante, asociada a una reacción inmune adversa, de manera que la persistencia del parásito y los mecanismos inmunológicos estarían intrínsecamente relacionados en la agresión en el miocardio a largo plazo (Marin-Neto y col., 2007). En este sentido, se han propuesto al menos seis mecanismos que podrían regir la patogénesis de la CCC: 1. espasmos micro vasculares, 2. isquemia, 3. eosinofilia o neutrofilia crónica, 4. toxicidad mediada por el parásito, 5. respuesta inmune anti-*T. cruzi* contra los parásitos o antígenos del parásito que persisten en el corazón y 6. autoinmunidad inducida por *T. cruzi* (Bilate & Cunha-Neto 2008).

El daño cardíaco durante el desarrollo de la fase crónica podría ser el resultado de la respuesta inmune efectora producida por la persistencia del parásito en los tejidos (Tarleton & Zhang, 1999) aunado a la respuesta autoinmune adicional que podría ser conducida por un mimetismo molecular entre el parásito y auto-antígenos, o por liberación y presentación de auto-antígenos derivados del daño celular (Girones & Fresno, 2003; Girones y col., 2005; Dos Reis y col., 2005; Girones y col., 2007). En este sentido, varios autores han propuesto que la persistencia del parásito es imprescindible pero no necesariamente suficiente para causar la enfermedad de Chagas crónica (Andersson y col., 2003).

### **Patología chagásica.**

Hace casi un siglo (1916) Carlos Chagas, descubridor de la enfermedad, señaló las diferencias entre las formas aguda y crónica de la infección, haciendo énfasis en el alto grado de invasión al corazón y el severo parasitismo miocárdico durante la fase aguda y el escaso número de parásitos asociados con la miocarditis en la fase crónica (Higuchi y col., 2003). El parásito *T. cruzi* es capaz de infectar cualquier tipo de tejidos derivados del mesodermo embrionario, mesodermo y neuroectodermo en el ser humano, sin embargo, la intensidad de la infección varía de un individuo a otro dependiendo de las características genéticas del hospedador y del parásito (Texeira y col., 2006). En este sentido, la replicación de *T. cruzi* ocurre en el citoplasma de diferentes tipos celulares, tales como macrófagos, fibroblastos,

fibras musculares esqueléticas y cardíacas, células epiteliales (Gutierrez y col., 2009), células de Schwann y células gliales pero no en neuronas (Teixeira y col., 2006). Durante la fase aguda el tropismo cardíaco de *T. cruzi* conlleva a la formación de nidos (pseudoquiste o cavidad sin pared limitante) del parásito en las células del miocardio, una característica patológica de esta fase inicial. Esta multiplicación intracelular crea una íntima relación parásito-hospedador, generando reacciones complejas en este a lo largo de la infección, la mayoría de ellas aun permanecen desconocidas. La distensión y ruptura de una célula, como consecuencia de la multiplicación de los parásitos en su interior, libera enzimas activadas, polipéptidos, prostaglandinas, citoquinas, etc. que son indicadores potenciales de inflamación, al igual que pueden funcionar como antígenos (Andrade, 2000).

Ha sido descrito que la inflamación es el proceso patológico básico en la enfermedad de Chagas y que depende de múltiples factores tales como: intensidad del parasitismo (virulencia), tropismo de la cepa del parásito y de la fase de la infección (Andrade, 2000). En humanos existen dos tipos de reacción inflamatoria asociadas a la enfermedad de Chagas, en primer lugar durante la fase aguda ocurre una reacción local (parásito dependiente) llevada a cabo por las células del sistema fagocítico mononuclear donde quiera que *T. cruzi* se multiplique provocando la ruptura de la célula parasitada (Andrade, 2000). Posteriormente, a los pocos días esta respuesta es ampliada con la presencia de neutrófilos y eosinófilos produciéndose congestión y edema en la zona afectada, y la presencia de este infiltrado celular inflamatorio coincide con el inicio de la producción de anticuerpos séricos. A nivel del corazón, ocurre un proceso más complejo. Durante la fase aguda de la infección en humanos, aparece en el miocardio un componente inflamatorio difuso y denso junto a las lesiones locales, que luego de un tiempo y tras una modulación inmunológica adquiere características de una reacción local, coincidiendo con la consolidación inmunológica del hospedador frente a la infección y pudiendo presentar síntomas como hipertrofia, flacidez y dilatación cardíaca (Teixeira y col., 2006). Sin embargo, esta modulación de la lesión inflamatoria difusa en el miocardio no es permanente y luego de un tiempo más o menos prolongado (fase crónica), aproximadamente un 30% de los pacientes infectados puede desarrollar un proceso de inflamación miocárdica difusa y progresiva en una virtual ausencia de parásitos y fibrosis extensiva (Bilate y col., 2003; Teixeira y col., 2006). Este tipo de

reacción peculiar que tiene lugar en el corazón ha sido denominada forma crónica cardíaca de la enfermedad de Chagas (Andrade, 2000). Las lesiones en la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) son compatibles con un proceso inflamación y remodelación del miocardio, el cual incluye miocarditis rica en macrófagos/células T, hipertrofia y fibrosis con daño a la fibra cardíaca (Higuchi y col., 2003). Durante esta fase crónica pueden aparecer patologías adicionales como perturbaciones en la conducción, pérdida de la autonomía, cardiomegalia, fibrosis, adelgazamiento de la pared ventricular y daños microvasculares (Gutierrez y col., 2009).

## MECANISMOS EFECTORES Y REGULADORES EN LA INFECCION POR *T. cruzi*.

### Células efectoras.

En las infecciones la respuesta inmunológica adquirida se considera del tipo T cooperadora (Th) 1 o Th2 de acuerdo al perfil de citoquinas predominante. La respuesta Th1 se caracteriza por la liberación de interleuquina (IL)-2, interferón (IFN)- $\gamma$  y del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , mientras que IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 están asociadas con la respuesta tipo Th2 (Mosmann y col., 1996) (Fig. V).

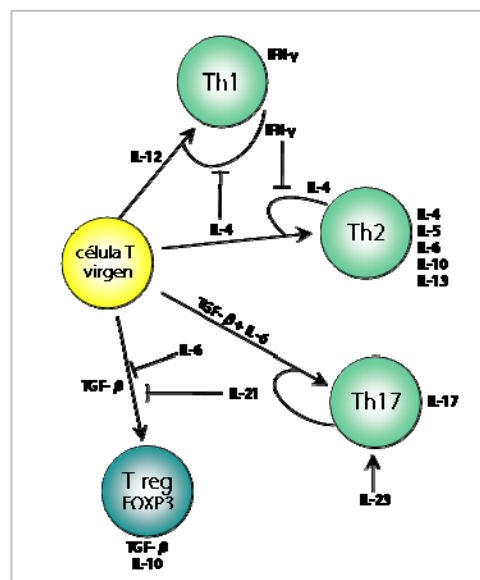


Figura V. Diferenciación de las células Th. Modificado de Deenick & Tangye (2007).

La resistencia a la infección con *T. cruzi* ha sido asociada con la mayoría de los mecanismos inmunes efectoras conocidos, que han sido estudiados primordialmente en

modelos experimentales en los que los ratones desarrollaban altas parasitemias (Cardoni y col., 1999). Seguidamente a la colonización de las fibras cardíacas por el tripanosoma, se dispara el reclutamiento de leucocitos hacia el tejido parasitado. La migración de las células del sistema inmunológico depende de la producción local de citoquinas y quimioquinas, así como del incremento de la expresión de sus receptores y moléculas de adhesión (Gutierrez y col., 2009).

Las principales subpoblaciones de linfocitos T  $\alpha\beta^+$  implicadas en el control de la infección por *T. cruzi* y en el desarrollo de mecanismos de inmunoprotección en el hospedador, son las células T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$  (Tarleton y col., 1992; Dos Reis y col., 1995; Tarleton y col., 1996). La respuesta inmune efectora en la infección por *T. cruzi*, involucra fundamentalmente la producción de anticuerpos específicos dependientes de linfocitos T  $CD4^+$  y el incremento de la actividad tripanocida de células fagocíticas por el IFN- $\gamma$ . Así, durante la infección aguda, la inducción de la respuesta Th1 es llevada a cabo por la IL-12, la cual estimula la producción de IFN- $\gamma$  en las células “natural killer” (NK). El IFN- $\gamma$  induce la activación de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) de macrófagos, con el consecuente incremento de óxido nítrico (NO) que participa en la destrucción intracelular de los parásitos. En la liberación de IFN- $\gamma$  también intervienen otros tipos de células, como los linfocitos  $Thy-1^+CD4^-CD8^-$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$  (Cardoni y col., 1999). Estos autores reportaron que en presencia de IFN- $\gamma$ , la coestimulación de macrófagos por otros mediadores, como el TNF- $\alpha$  y el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), produjo un incremento adicional de la producción de NO y de la destrucción intracelular de los parásitos. Estudios llevados a cabo por Silva y col. (1992), demostraron que la citoquina IL-10 fue capaz de bloquear la capacidad del IFN- $\gamma$  de inhibir la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos peritoneales, sugiriendo un papel regulatorio para esta citoquina durante la fase aguda de la infección. En la infección experimental con *T. cruzi*, a semejanza de lo que ocurre en la mayoría de las infecciones, el TNF- $\alpha$  en bajas concentraciones actúa sinérgicamente con el IFN- $\gamma$  en la protección contra el parásito, mientras que si alcanza altos niveles actúa en detrimento del hospedador, incrementando la reacción inflamatoria tisular (Cardoni y col., 1999).

Durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas en los seres humanos, existen alteraciones inflamatorias con un adecuado balance de linfocitos T CD4 y T CD8, mientras que en la fase crónica se ha observado una hipertrofia progresiva de las fibras cardíacas con disminución en la relación CD4/CD8, por lo cual los autores sugieren un desarrollo de inmunosupresión en el hospedador (Fuenmayor y col., 2005). Goñi y col. (2002) reportaron un mecanismo de inmunosupresión por IFN- $\gamma$  en la infección por *T. cruzi*, dependiente de la inducción de la iNOS en la población de células mieloides inmaduras Ly-6G (Gr1)<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Recientemente, estudios del infiltrado cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi*, han detectado la presencia de células mieloides que expresan iNOS y arginasa, durante la fase aguda de la infección (Cuervo y col., 2008), capaces de suprimir la proliferación de las células T, por lo que se trata de células mieloides supresoras (Cuervo y col., artículo sometido).

### **Células T reguladoras.**

La persistencia del parásito depende probablemente de una combinación de factores incluyendo la liberación de moléculas que inducen supresión de células T, activación policlonal de linfocitos y apoptosis de células del hospedador (Dos Reis y col., 2005). En este sentido, una vez que la respuesta inmune se inicia por la estimulación antigénica, los mecanismos reguladores deben controlar la magnitud de la respuesta. La regulación negativa o supresión contribuye al control homeostático de la repuesta inmune y sirve para limitar la expansión clonal y la actividad efectora de las células del sistema inmune hacia un estímulo antigénico.

En 1995 Sakaguchi y col. (Sakaguchi y col., 1995) reportaron la contribución de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> al mantenimiento de la autotolerancia mediante la disminución de la respuesta inmunológica contra antígenos propios y extraños previniendo la expansión de linfocitos autoreactivos y la consecuente autoinmunidad. Estas células con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, fueron denominadas células T reguladoras (T reg), derivan del timo de manera única, tienen actividad supresora de la respuesta inmune y constituyen del 5 al 10% de las células T CD4<sup>+</sup> circulantes en ratones y humanos. Su influencia en la respuesta a autoantígenos, antígenos tumorales y antígenos exógenos ha sido ampliamente demostrada (Belkaid y col., 2002). Además de expresar constitutivamente altos niveles de CD25<sup>+</sup>, las



células T reg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 (“forkhead box” P3). Las proteínas FOX cumplen un papel importante en la regulación de la expresión de genes involucrados en crecimiento celular, proliferación, diferenciación, longevidad y desarrollo embrionario. La característica que define las proteínas FOX es la “forkhead box”, una secuencia de 80 a 100 aminoácidos que forman un motivo de unión al ADN. Esta habilidad para unirse al ADN permite a las proteínas FOX regular la expresión de los genes diana. FOXP3 es un miembro de la familia “forkhead/winged helix” de reguladores transcripcionales, compuesto por 431 aminoácidos y actúa como el principal regulador en el desarrollo y función de las células T reguladoras, es represor de la transcripción de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  a través de la interacción física directa con el factor nuclear  $\kappa$ -B (NF $\kappa$ -B) y el factor nuclear de activación de células T (NFAT). En efecto, estudios recientes han demostrado que el complejo NFAT-FOXP3 es requerido para la actividad supresora de las células T (Miyara & Sakaguchi, 2007).

De acuerdo a sus distintos mecanismos supresores se han descrito varios subtipos de células T reg (Jonuleit & Schmitt 2003; San Segundo y col., 2007):

1- Las células T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturales generadas en el timo, que sobreviven en la periferia y controlan a las células autoreactivas mediante el contacto célula a célula a través de moléculas de unión a membrana. Expresan constitutivamente el receptor de la IL-2 (IL-2R) y el factor de transcripción FOXP3, distinguiéndolas de las células CD4<sup>+</sup> recién activadas.

2- Las células T reguladoras inducidas (iTreg), que también expresan el factor de transcripción FOXP3. Existen dos tipos de iTreg: las tipo 1 (Tr1) y las células iTreg tipo 3 (Th3). Ambas se generan en la periferia a partir de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> vírgenes cuando el antígeno es presentado por células presentadoras de antígeno (APC) en presencia de concentraciones determinadas de citoquinas como IL-2 o el “transforming growth factor” (TGF)- $\beta$ . Su capacidad supresora es independiente del contacto celular, basándose principalmente en la secreción de citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$ . (Fig. VI).

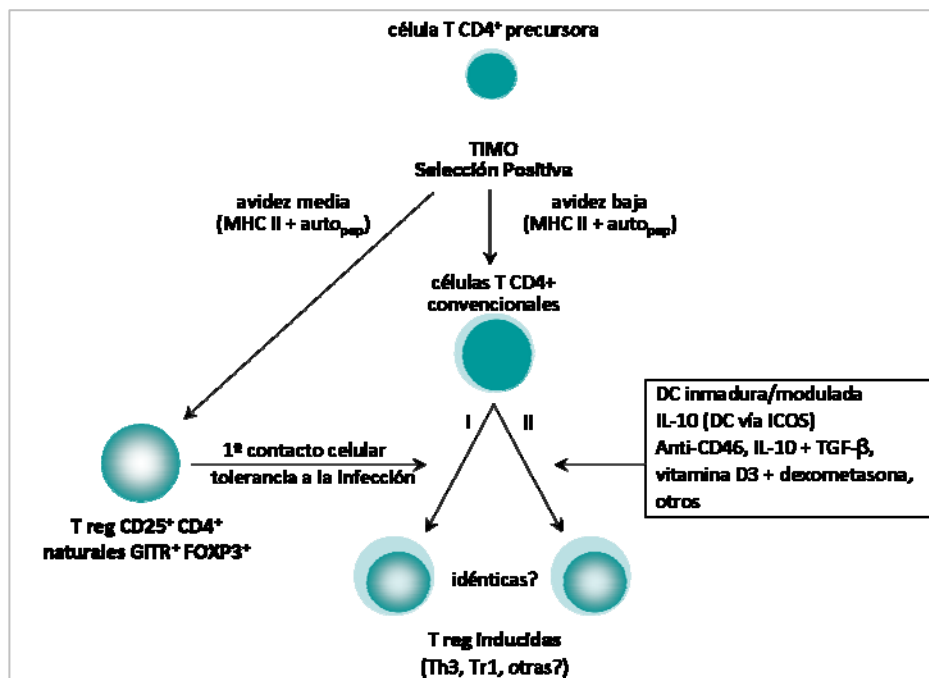


Figura VI. Desarrollo e interrelación de los subconjuntos de células T reguladoras. Modificado de Jonuliet & Schmitt, 2003.

La citoquina anti-inflamatoria IL-10 es producida por varios tipos celulares, tales como, células Th1, células Th2, células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, linfocitos CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y células presentadoras de antígenos. El TGF-β puede ser producido por linfocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales.

Estudios previos han demostrado que en humanos y ratones, las células Tr1 generadas *in vitro* no expresan constitutivamente el factor de transcripción FOXP3, sin embargo, tras la activación puede aumentar este factor de transcripción alcanzando valores similares a los observados en células T efectoras humanas (Roncarolo & Gregory, 2008).

En el año 2005, Sakaguchi demostró que las células T reg naturales contribuían al control de la respuesta inmune inducida por autoantígenos o por antígenos extraños. Esto fue corroborado por Fu y col. (2006), quienes demostraron que las células T reg cumplían un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica contra autoantígenos y antígenos extraños y en la supresión de la respuesta inmune de células T en humanos. Miyara & Sakaguchi (2007) indicaron que las células T reg podían suprimir activamente la

respuesta inmunológica tanto patológica como fisiológica, contribuyendo al mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica y la homeostasis inmunitaria.

Varios eventos moleculares y celulares han sido propuestos por estos investigadores para explicar como estas células pueden suprimir la respuesta inmune: 1) Inhibición de la expresión del gen IL-2, modulación de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígenos y la interacción del “lymphocyte activation gene” (LAG-3) con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, 2) Secreción de citoquinas inmunosupresoras, 3) Inducción del catabolismo del triptófano a través del “cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4” (CTLA-4) y 4) citotoxicidad. Sin embargo, ninguno de estos mecanismos puede explicar todos los aspectos de la supresión. Proponen que dependiendo del entorno y del tipo de respuesta inmune, pueden producirse varias combinaciones de estos mecanismos. Finalmente sugieren que podría existir un solo mecanismo clave que aún no ha sido identificado.

Las células T reg, tanto las naturales circulantes en la periferia, como aquellas inducidas por la infección, contribuyen a controlar la función de las células efectoras y el daño asociado en los tejidos del hospedador (Mills, 2004). Esta regulación ejercida por las células T reg puede ser excesiva, evitando así el establecimiento de la respuesta inmune protectora, o por el contrario, este control puede no ser suficiente para prevenir las inmunopatologías (Belkaid, 2008).

De esta manera, durante una infección parasitaria la inmunoregulación puede surgir como un efecto atenuador de la respuesta del hospedador al proceso parasítico y/o puede ser inducida activamente por el parásito como una estrategia de supervivencia, pudiendo desempeñar un papel importante en la interacción hospedador-parásito (Belkaid y col., 2006). Por una parte, una regulación excesiva de la respuesta inmune efectora podría conducir a un crecimiento descontrolado del parásito y a la eventual muerte del hospedador o por el contrario, la inmunoregulación podría controlar la patología inducida por el parásito resultando beneficiosa para el hospedador. Por otro lado, sí la respuesta inmune efectora es capaz de eliminar eficientemente el patógeno, el hospedador podría morir debido a esta respuesta inmunológica descontrolada, en este caso la inmunoregulación resultaría

beneficiosa en el control de la inmunopatología evitando la muerte del hospedador. Las infecciones persistentes o crónicas estarían en una situación intermedia, donde la inmunoregulación podría ser favorable controlando la patología y la inmunopatología y manteniendo una inmunidad a largo plazo en contra de la reinfección y proporcionando un control “bystander” de la respuesta inmunológica o por el contrario, esta supresión podría ser dañina induciendo una inmunosupresión sistémica (Fig. VII).

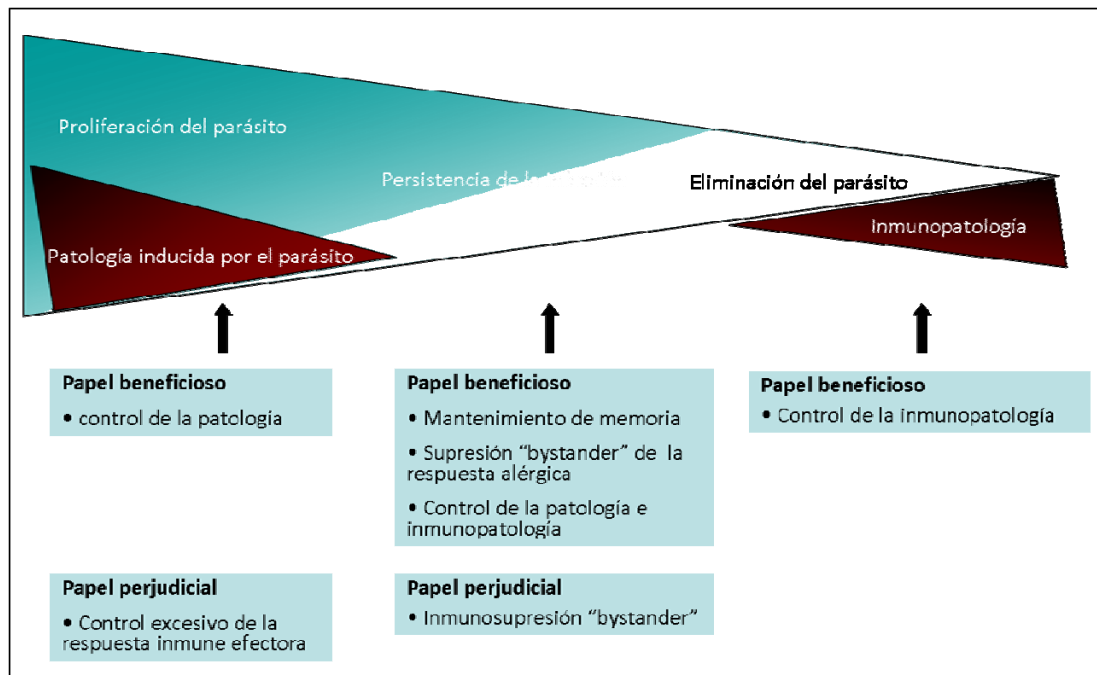


Figura VII. Papel beneficioso ó perjudicial de la respuesta inmune reguladora durante infecciones parasíticas. El triángulo azul representa el número de parásitos y los triángulos rojos la manifestación de la enfermedad. Modificado de Belkaid y col., 2006.

Belkaid (Belkaid 2007) sugiere que el mecanismo de supresión y la naturaleza de las células T reg involucradas en el proceso infeccioso dependen de la intensidad y del estadio del ciclo patológico. Durante una infección aguda, las células T reg naturales policlonales podrían contribuir al control del proceso inflamatorio, mientras que, durante las infecciones crónicas con respuesta sostenida de células cooperadoras Th1 ó Th2, varios procesos reguladores podrían contribuir a la regulación de la respuesta inmunológica. La inducción de la respuesta reguladora está normalmente asociada al cese de la respuesta inmune efectora. Este fenómeno, puede llevarse a cabo directamente a través de la inducción de citoquinas inmunomoduladoras del hospedador tales como IL-10 y TGF- $\beta$ , producidas por células de la respuesta inmune innata contra las moléculas derivadas del patógeno, o bien,

indirectamente a través de la generación de células T reg. De esta manera las células T reg naturales podrían producir las citoquinas IL-10 ó TGF- $\beta$  para prevenir el daño tisular, acumulándose células T reg específicas contra el patógeno en el sitio de la infección. Durante las infecciones que inducen una respuesta sostenida Th1, las propias células Th1 también podrían contribuir a la limitación de la respuesta inmune y al daño tisular a través de la liberación de IL-10 (Belkaid 2007).

Como mencionamos anteriormente, la función inmunomoduladora natural de células T reg endógenas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> para limitar la respuesta inmune hiperactiva puede ser aprovechada por los patógenos para persistir a pesar de la respuesta del hospedador. En este sentido, Belkaid y col. (Belkaid y col., 2002) determinaron que las células T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son capaces de controlar la persistencia del parásito tripanosomatideo *Leishmania mayor* y que la misma persistencia de éste es requerida para el mantenimiento de la inmunidad protectora. En ratones infectados con *Trypanosoma congolense* (tripanosomiasis africana) las células T reg previenen la activación de las células CD8<sup>+</sup> NKT las cuales podrían activar a los macrófagos a producir NO para eliminar los parásitos, es decir previenen el control de la tripanosomiasis africana experimental (Wei & Tabel 2008). En trabajos previos se ha descrito que en la enfermedad de Chagas, la IL-10 puede actuar suprimiendo las reacciones Th1 protectoras (producción de anticuerpos específicos y activación de células fagocíticas por IFN- $\gamma$ ) resultando en infecciones crónicas. Así mismo, el TGF- $\beta$  es capaz de regular negativamente el control intracelular de la infección por *T. cruzi*.

Se ha propuesto que la severidad de la Enfermedad de Chagas podría estar correlacionada con un parasitismo persistente en el tejido muscular, nervioso y digestivo (Kotner & Tarleton 2007). Estos autores reportan que la eliminación de las T reg no aumenta la inmunidad protectora, control o replicación del parásito ni la supervivencia de los ratones infectados con *T. cruzi*. Por lo que sugieren que las células T reg no parecen ser necesarias para la evasión de *T. cruzi* a la respuesta inmunológica durante la infección aguda o crónica, no ejerciendo un papel importante en el control de la respuesta de las células T efectoras CD8<sup>+</sup> durante la fase aguda o crónica de la infección. Por el contrario, en pacientes con la enfermedad de Chagas, las células T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> parecen tener un papel

importante en la respuesta inmune contra la infección por *T. cruzi*, con efectos diferentes en las formas indeterminada y cardíaca de la enfermedad (Araujo y col., 2007).

Recientemente ha sido descrito que durante la fase aguda de la infección experimental por *T. cruzi*, las células T reg aunque tienen una función inmunoreguladora limitada debido a la disminución de la activación de las células T CD4<sup>+</sup>, no desempeñan un papel crítico en la patogénesis (Sales y col., 2008). Contrariamente, otros investigadores sugieren que las células T reg están involucradas en la patogénesis de la enfermedad y que su función supresora parece ser dependiente de la señalización de “glucocorticoid induced tumor factor receptor” (GITR), siendo determinante en el control de la inflamación cardíaca, replicación del parásito y en la resistencia del hospedador a la infección (Mariano y col., 2008).

Estudios recientes sobre la inmunidad innata sugieren que la morbilidad observada en infecciones crónicas por *T. cruzi*, podría ser causada por acción de los efectores de la inmunidad innata o por la carencia de los mecanismos reguladores que disminuyen la respuesta efectora. En este sentido, interacciones hospedador-parásito asintomáticas estables, parecen estar influenciadas por el balance efector/regulador, con la participación de macrófagos, células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en paralelo con el establecimiento de mecanismos reguladores mediados por células NK y T reg. Un estado de activación equilibrado de la inmunidad innata distinto de las células T reg podría jugar un papel en el control de los eventos adversos desencadenados por la liberación masiva de antígenos producida por agentes tripanocidas durante el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas (Sathler-Avelar y col., 2009).

### **Células Th17.**

La reciente descripción de un nuevo linaje de células T CD4<sup>+</sup>, distinto de las Th1, Th2 y T reg, ha revolucionado el conocimiento sobre la inmunidad mediada por linfocitos T, estas células son conocidas como Th17 (Wynn, 2005). Las Th17 desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos y se les ha atribuido un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (Serrano, 2009). Estas células se diferencian a partir del mismo

precursor que las células Th1 y Th2 y para ello requieren la participación de las citoquinas IL-6 y TGF- $\beta$  (Stockinger & Velhoen, 2008), mientras que para su desarrollo requieren IL-23, IL-1 y el TNF- $\alpha$  (Yoshida y col., 2007a). La diferenciación de las células efectoras Th17 está dirigida por el factor de transcripción “retinoid orphan nuclear receptor” (ROR)- $\gamma$ t, el cual está expresado específicamente en estas células, tanto en humanos como en ratones. Se ha demostrado que la estimulación de células T vírgenes con TGF- $\beta$  e IL-6 aumenta la expresión del ARNm de ROR- $\gamma$ t y que la expresión de este factor de transcripción en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes es necesaria y suficiente para inducir las citoquinas IL-17A, IL-17F y la expresión de IL-23 (Ivanov y col., 2006). Así mismo, el factor de transcripción “signal transducers and activator of transcription” (STAT)3 es esencial para la diferenciación de las Th17, posiblemente a través de la inducción de dos receptores nucleares, ROR $\alpha$  y ROR- $\gamma$ t, no obstante, la relación entre ROR- $\gamma$ t y STAT3 aun no ha sido bien determinada y requiere ser mas estudiada (Chen y col., 2008). (Fig. VIII). Otra molécula esencial para la generación de las Th17 es el “interferon regulatory factor” (IRF)-4 la cual puede regular la expresión de ROR- $\gamma$ t (Brustle y col., 2007)

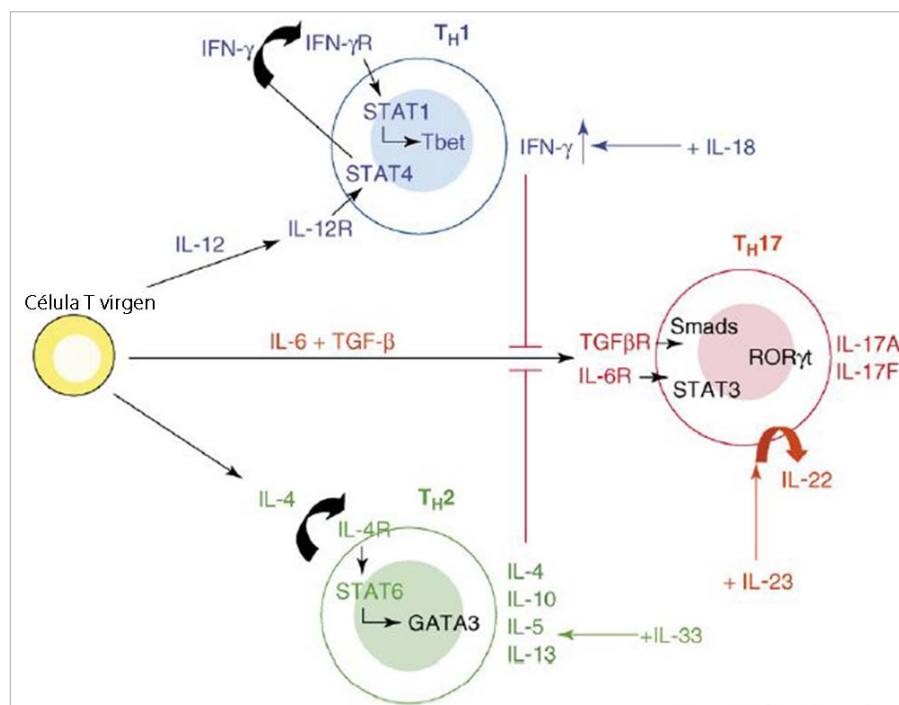


Figura VIII. Diferenciación de las células Th17 a partir de células T CD4 vírgenes. Modificado de Stockinger & Velhoen, 2008.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> αβ, T γδ y las células NK han sido descritas como productoras de la citoquina proinflamatoria IL-17. Esta citoquina promueve varias respuestas inflamatorias desempeñando un papel importante en la dirección de la respuesta inmune innata, así mismo, es requerida para la defensa contra algunos patógenos extracelulares, encontrándose también exacerbada en enfermedades autoinmunes (Yoshida y col., 2007a; Roark y col., 2008). La IL-17 puede inducir otras citoquinas inflamatorias tales como TNF-α y está implicada en el reclutamiento de neutrófilos (Yoshida y col., 2007b). Estos últimos constituyen el tipo de leucocitos más abundante en sangre y son capaces de migrar fuera del lecho vascular durante una infección aguda. La sobreproducción de IL-17 puede causar ciertas enfermedades inflamatorias, tales como encefalitis autoinmune experimental, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, lupus y rechazo a trasplantes (Wynn, 2005). No obstante, los mecanismos moleculares involucrados en la función patogénica de las Th17 en algunas enfermedades aun no están totalmente esclarecidos (Nuviera & Dong, 2008).

Dado que la citoquina TGF-β es crucial para el desarrollo de las células Th17, se ha sugerido que las células Th17 y las células T reg comparten vías de desarrollo recíprocas durante la patogénesis o control de la inflamación (McGeachy & Cua 2008). Aunque ha sido reportado que la citoquina IL-17 cumple un papel muy importante en la resolución de infecciones bacterianas a través de la inducción de inflamación y reclutamiento de neutrófilos, su papel en la defensa del hospedador contra patógenos intracelulares, especialmente protozoarios parásitos, aún no ha sido esclarecido. En este sentido, Yoshida y col. (Yoshida y col., 2007b) sugieren que la citoquina IL-17 podría desempeñar un papel importante en la resolución de la infección por *T. cruzi* mediante la inducción de inflamación y posiblemente a través de péptidos anti-microbianos. Dada la reciente implicación de las células Th17 en infecciones agudas, crónicas y en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, esta población linfocitaria podría ser fundamental en el desarrollo del proceso inflamatorio cardíaco de la enfermedad de Chagas.



## II. OBJETIVOS.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el estudio del desarrollo y modulación de la patología chagásica cardíaca en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*, así como el posible papel de las células T reg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> y Th17 en la patología chagásica cardíaca y su relación con la persistencia del parásito durante las fases aguda y crónica de la infección.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Evaluar el efecto del inóculo de parásitos sobre la parasitemia, carga parasitaria cardíaca, supervivencia y respuesta inmunológica, empleando cepas de ratones con distinta susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*.
2. Analizar la respuesta inmunológica en órganos linfoides, durante las fases aguda y crónica de la infección.
3. Estudiar el infiltrado celular inflamatorio y las citoquinas pro-inflamatorias, inmunosupresoras o inmunomoduladoras, presentes en el corazón de los ratones, durante las fases aguda y crónica de la enfermedad.
4. Determinar la presencia de las células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y Th17 en el corazón y en diferentes órganos linfoides de los ratones, durante el curso de la infección.



### III. MATERIALES Y METODOS.

#### 1. MATERIALES

##### 1.1. Animales de experimentación.

- a. **Parásito:** la cepa Y de *T. cruzi* empleada para infectar los ratones, fue obtenida del Departamento de Medicina del Harvard Medical School, Boston, Massachussets y mantenida en el CBM mediante pases de ratón a ratón. Esta cepa, fue aislada originalmente de un caso humano en Brasil, ha sido descrita como altamente virulenta en ratones y con tropismo cardíaco.
- b. **Ratones:** utilizamos ratones *Mus musculus* de fondo genético BALB/c y C57BL/6, isogénicos, hembras de 8 - 10 semanas de edad y procedentes de Harlan Laboratories. Los animales fueron mantenidos en el animalario del CBMSO y su manipulación y cuidado fue llevado a cabo según la normativa bioética Europea vigente (Convención, 1986).  
La cepa de ratones BALB/c ha sido descrita como susceptible a la infección por *T. cruzi* y la cepa C57BL/6 como menos susceptible o resistente.

## 1.2. Anticuerpos y reactivos.

### 1.2.1. Anticuerpos.

Nombre	Características – Aplicación (Referencia)	Origen
Anti-ratón CD3	Ac. Mc. rata acoplado a PE-Cy5 - FACS (555276)	BD Pharmingen
anti-ratón CD3e	Estimulación de linfocitos T (553058)	BD Pharmingen
anti-ratón CD4	Ac. Mc. rata acoplado a PE - FACS (553049)	BD Pharmingen
anti-ratón CD4	Ac. Mc. rata acoplado a FITC - FACS (553047)	BD Pharmingen
anti-ratón CD8a	Ac. Mc. rata acoplado a PE - FACS (553032)	BD Pharmingen
anti-ratón CD11b	Ac. Mc. rata acoplado a Alexa Fluor 647–FACS (557686)	BD Pharmingen
anti-ratón CD11c	Ac. Mc. hamster acoplado a FITC- FACS (557400)	BD Pharmingen
anti-ratón CD16/CD32 Fc block	Ac. rata para bloquear los receptores Fc (553142)	BD Pharmingen
anti-ratón CD25 (IL2 R $\alpha$ )	Ac. Mc. rata acoplado a APC - FACS (17-0251)	eBioscience
anti-ratón CD25 (IL2 R $\alpha$ )	Ac. Mc. rata acoplado a PE - FACS (553866)	BD Pharmingen
anti-ratón CD28	Estimulación de linfocitos T (557393)	BD Pharmingen
anti-ratón CD45R-B220	Ac. Mc. rata acoplado a PE - FACS (553089)	BD Pharmingen
anti-ratón CTLA-4 (CD152)	Ac. Mc. hamster acoplado a PE - FACS (12-1522)	eBioscience
anti-ratón F4/80	Ac. Mc. rata acoplado a FITC - FACS (11-4801-82)	eBioscience
anti-ratón FOXP3	Ac. Mc. rata acoplado a PE - FACS (12-4776)	eBioscience
anti-ratón FR4	Ac. Mc. rata acoplado a Alexa Fluor 647- FACS (51-5445)	eBioscience
anti-ratón GITR	Ac. Mc. rata acoplado a FITC - FACS (11-5874)	eBioscience
anti-ratón IL-17A	Ac. rata acoplado a APC - FACS (17-7177)	eBioscience
control isotípico hamster-IgG	Ac. Mc. acoplado a PE - FACS (12-4888)	eBioscience
control isotípico rata IgG2b, k	Ac. Mc. acoplado a FITC - FACS (553988)	BD Pharmingen
control isotípico rata IgG2a, k	Ac. Mc. acoplado a PE - FACS (553930)	BD Pharmingen
control isotípico rata IgG2a, k	Ac. Mc. acoplado a APC - FACS (17-4321)	eBioscience
control isotípico rata IgG2b	Ac. Mc. acoplado a Alexa Fluor 647 - FACS (51-4732)	eBioscience

**1.2.2. Reactivos.**

Nombre	Características (Referencia)	Origen
Hematoxilina, Eosina	Tinción celular de contraste	Fluka, Merck
DNAse I	Evita agregación celular durante la digestión enzimática de tejidos (11284932001)	Roche
Colagenasa Tipo 2	Digestion de tejidos (LS004204)	Worthington Biochemical Corporation
Trizol	Aislamiento de ARN total (15596-018)	Life Technologies
Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex	Kit de medición de GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ (BMS820FF)	Bender MedSystems
Mouse IL-23 FlowCytomix Simplex	Medición de IL-23 (BMS86017FF)	Bender MedSystems
BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	Fijación y permeabilización celular (555028)	BD Biosciences
High Pure PCR Template Preparation Kit	Aislamiento de ADN (11796828001)	Roche
Polimerasa FastStar Taq	Síntesis de ADN (12 032 929 001)	Roche
dNTPs	Síntesis de ADN (N8080007)	Applied Biosystems
Ficoll-Paque PREMIUM 1084	Purificación de PBMNC (17-5446-02)	GE Healthcare
Timidina,[Metil- $^3$ H]	Marcaje de células con radioactividad (NET027A005MC)	Perkin, Elmer
Heparina sódica Chiesi	Anticoagulante (1000UI/ml) (962357)	B. Braun Medical

### 1.3. Oligonucleotidos.

#### 1.3.1. Oligonucleótidos y sondas Taqman para PCR

Nombre	Secuencia (5' a 3') / Referencia	Origen
CD4	Mm 00442754-m1	Applied Biosystems
CD8a	Mm 01182107-g1	Applied Biosystems
CD11c	Mm 00498698-m1	Applied Biosystems
CD68	Mm 00839636-g1	Applied Biosystems
B220	Mm 00448463-m1	Applied Biosystems
IL-1 $\alpha$	Mm 99999060-m1	Applied Biosystems
IL-2	Mm 00434256-m1	Applied Biosystems
IL-6	Mm 00446190-m1	Applied Biosystems
IL-10	Mm 00439616-m1	Applied Biosystems
IL-17	Mm00439619_m1	Applied Biosystems
IL-23	Mm00518984_m1	Applied Biosystems
IFN- $\gamma$	Mm 00801778-m1	Applied Biosystems
TGF- $\beta$	Mm 00441724-m1	Applied Biosystems
TNF- $\alpha$	Mm 00443258-m1	Applied Biosystems
CTLA-4	Mm 00486849-m1	Applied Biosystems
FOXP3	Mm 00475156-m1	Applied Biosystems
GITR	Mm 00437136-m1	Applied Biosystems
FOLR-4	Mm00491662-m1	Applied Biosystems
ROR $\gamma$ t	Mm01261022-m1	Applied Biosystems
IRF-4	Mm 00516431-m1	Applied Biosystems
STAT-3	Mm01219775-m1	Applied Biosystems
18 S	Hs99999901-s1	Applied Biosystems
TCZ1	CGAGCTCTTGCCACACGGG	Invitrogen
TCZ2	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	Invitrogen
TCZ3	TGCTGCASTCGGCTGATCGTTTTCGA	Invitrogen
TCZ4	CARGSTTGTTGGTGTCAGTGTGTGA	Invitrogen
Cruzi 1	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	Invitrogen
Cruzi 2	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Invitrogen
Cruzi 3	(FAM)-CACACACTGGACACCAA- (TAMRA)	Invitrogen
TNF-5241	TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA	Invitrogen
TNF-5411	CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC	Invitrogen

## **2. METODOS.**

### **2.1. Modelos experimentales.**

El empleo de cepas de ratones con susceptibilidades variables a la infección por *T. cruzi* y de diferentes inóculos de una cepa altamente virulenta del parásito, nos permitió establecer modelos experimentales que por sus características parasitológicas de virulencia y mortalidad, podrían ser considerados como una infección aguda fulminante, o una infección a largo plazo similar a la fase crónica de la enfermedad de Chagas en humanos.

La infección de los ratones fue llevada a cabo por vía intraperitoneal a partir de tripomastigotes sanguíneos obtenidos de un ratón infectado y en el valor máximo de parasitemia. Para ello se anestesió el animal con nembutal sódico y fue sangrado completamente por punción cardiaca en presencia de heparina sódica 0,1%. El número de flagelados por ml de sangre fue determinado por el método de Brener (descrito mas adelante). Una vez conocida la concentración de tripomastigotes se procedió a preparar la suspensión adecuada de parásitos en “buffer fosfato salino” (PBS) pH 7,4).

Grupos experimentales:

- i. Grupos de 20-35 ratones BALB/c y C57BL/6 fueron infectados con 50 tripomastigotes/ratón (“inóculo bajo”). El uso de este inóculo en ratones susceptibles nos permitió evaluarlos durante la fase crónica de la infección.
- ii. Grupos de 15-25 ratones BALB/c y C57BL/6 fueron infectados con  $2 \times 10^3$  tripomastigotes/ratón. Este inóculo fue designado “inóculo alto”.

La evaluación parasitológica, inmunológica y celular de los animales fue realizada durante las etapas aguda y crónica de la infección para establecer su relación con el desarrollo de la patología chagásica y persistencia del parásito. Los ratones fueron sacrificados para su estudio de acuerdo al siguiente diseño experimental:

FASE	dpi	BALB/c inóculo		C57BL/6 inóculo	
		bajo	alto	bajo	alto
Aguda	7	X	X	X	X
	12	X	X	X	X
	17	X	X	X	X
	22	X		X	X
Crónica	100	X		X	X
	245	X		X	
	450			X	

d.p.i.: día postinfección

Se emplearon grupos de 5 a 10 ratones no infectados (NI) como control en cada experimento. Los animales fueron sacrificados por sobredosis de tiopental sódico (Pentotal Sodico, Abbott Laboratories, S.A.) administrado por vía intraperitoneal.

## 2.2. Parasitemia y supervivencia de los ratones.

Mediante evaluación microscópica directa de la sangre de los animales infectados, detectamos la presencia del parásito circulante (tripomastigote sanguíneo). La parasitemia de los ratones BALB/c y C57BL/6 fue evaluada cada 2 a 3 días durante el primer mes de infección (fase aguda) y luego a intervalos de 10 a 20 días hasta los 100 días post infección (d.p.i.) (fase crónica). Para ello se siguió el método de Brener (Brener 1962). Brevemente: mediante un micro capilar se colectaron 5µl de sangre de la cola del ratón. La sangre fue colocada en un portaobjeto y cubierta con un cubreobjetos de 22x22 mm, distribuyéndola homogéneamente para obtener una sola capa de células. Inmediatamente se procedió a contar el número de flagelados en 50 campos microscópicos y este valor fue multiplicado por el factor del microscopio, el cual fue calculado previamente.

La supervivencia de los ratones fue monitoreada a diario durante el período de observación.



### 2.3. Análisis histológico.

Estudios post-mortem de los corazones de los ratones infectados, nos permitieron determinar la presencia de parásitos intratisulares durante la evolución de la infección. Las piezas de órganos preservadas en formalina al 10% fueron incluidas en parafina utilizando el inclusor de parafina Leica EG1160. Secciones seriales fueron cortadas a 5 a 10 micras con el microtomo motorizado Leica RM 2155 y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H & E). Los cortes fueron estudiados usando un microscopio Leica, equipado con una cámara Leica DFC 420 C (Wetzlan, Germany).

### 2.4. Detección de ADN de *T. cruzi* en el tejido cardíaco mediante PCR Múltiplex y PCR cuantitativa a tiempo real.

Se evaluó la presencia de ADN de *T. cruzi* en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados, durante las fases aguda y crónica de la infección experimental. El corazón de ratones sanos e infectados fue extraído y perfundido con una solución de PBS conteniendo 0,1% heparina sódica, a fin de eliminar la sangre periférica contenida en el interior de las cavidades cardíacas que podría contener tripomastigotes circulantes. El órgano fue cortado en pequeños trozos y la purificación del ADN total del tejido cardíaco se llevó a cabo utilizando el kit “High Pure PCR Template Preparation” (Roche), según el protocolo establecido. La concentración de ADN fue determinada mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000).

Una modificación del ensayo Nested-PCR (Marcon, Andrade et al. 2002) realizada por Guerrero (2007), fue empleada para realizar la PCR Múltiplex. Se utilizaron las sondas TCZ1, TCZ2, TCZ3 y TCZ4. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con 100 ng de ADN molde. El programa de la PCR se realizó en un Termociclador “My Cycler” (Biorad). El amplicón de 166-188pb fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio (0,003 %) y luego fue visualizado en un transiluminador ultravioleta.

Así mismo, se emplearon 100 ng de ADN genómico para la detección del parásito mediante el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) (Piron y col., 2007). El ADN del parásito fue cuantificado utilizando la curva de calibración generada a partir de ADN

purificado de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (Cuervo y col., 2008). Para el control de carga se realizaron qPCR con oligonucleótidos específicos para la secuencia genómica de TNF de ratón.

## **2.5. Análisis de la transcripción génica (RT-PCR).**

El corazón de los ratones fue extraído y perfundido según lo descrito anteriormente. El aislamiento del ARN total se llevó a cabo por disrupción mecánica empleando un homogeneizador de tejidos “Polytron PT1300D” (Brinkmann Lauda) y con el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para el análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), se realizó la transcripción reversa del ARN total, mediante la utilización del kit “High Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems). La amplificación del ARNm de los genes (CD4, CD8, CD68, B220, CD11c, FR4, GITR, CTLA-4, ROR $\gamma$ t, STAT3, IRF4, FOXP3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-17, IL-23, TGF- $\beta$  e IL-10,) se llevó a cabo utilizando el kit “TaqMan Universal PCR Master Mix” con sondas “Taqman MGB” específicas para los distintos genes en un equipo de PCR “ABI PRISM 7900HT” (Applied Biosystems). Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado. Todas las cuantificaciones fueron normalizadas frente al control endógeno 18S para considerar la variabilidad en la concentración inicial de ARN y en la eficiencia de la conversión de la reacción de transcripción reversa ( $\Delta$ Ct). La cuantificación de la expresión de ARNm fue calculada comparando el ciclo umbral de expresión ( $\Delta\Delta$ Ct) de las muestras con respecto al basal, siguiendo las instrucciones del fabricante (SDS 2.1 software, Applied Biosystems). El valor de RQ ( $RQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$ ) de los ratones infectados fue dividido por el RQ promedio de los ratones no infectados. En las gráficas los datos están representados como veces de inducción del ARNm del ratón infectado respecto no infectado.

## **2.6. Cultivos primarios.**

Bazos extraídos estérilmente de ratones no infectados e infectados, fueron disgregados en filtros celulares de nylon de 40  $\mu$ m (Falcon). Las células purificadas fueron contadas y sembradas a razón de  $2 \times 10^6$  células/pocillo en medio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, BioWithaker) a 37°C en atmósfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue complementado con 100 U/ml de

penicilina, 1000U/ml de gentamicina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales. Las células fueron estimuladas o no (grupo control) con 10 µg/ml de anti-CD3 purificado y 2 µg/ml de anti-CD28. Los sobrenadantes de cultivo fueron colectados a las 72 horas y empleados para cuantificación de citoquinas.

## **2.7. Cuantificación de citoquinas.**

El kit “Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex” (Bender Medsystems) fue utilizado para medir la cantidad de citoquinas (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α y GM-CSF) presentes en el sobrenadante de esplenocitos cultivados *in vitro* (ver apartado 2.6) y en el suero sanguíneo de ratones BALB/c y C57BL/6 no infectados e infectados en distintas fases de la enfermedad experimental. La concentración de la citoquina IL-23 fue determinada en las muestras de suero de estos ratones empleando el kit “Mouse IL-23 FlowCytomix Simplex (Bender Medsystems). Cada muestra fue analizada independientemente y por duplicado. Se siguieron las instrucciones de la casa comercial y las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Los datos fueron analizados con el programa Flowcytomix Pro 2.3 Software.

## **2.8. Aislamiento de células esplénicas, tímicas y PBMNCs.**

Timos y bazo s fueron extraídos asépticamente de los ratones de cada grupo experimental y fueron colectados en “pool” y luego macerados en un filtro celular de 40 µm (Falcon). Los eritrocitos presentes en la suspensión celular fueron eliminados por lisis hipotónica a 4°C.

Sangre de los ratones fue extraída por punción cardiaca, en presencia de heparina sódica. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs) fueron obtenidas empleando el reactivo Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las células fueron contadas en cámara de Neuvauer, fijadas con 1% de paraformaldehído (PFA) por 20 minutos a 4°C, luego lavadas con PBS frío y resuspendidas en buffer de tinción conteniendo 1 % de sero albúmina bovina (BSA) y 1 % de SFB en PBS.

## 2.9. Purificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en el corazón de ratones infectados.

Un total de veinticinco corazones provenientes de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*, fueron extraídos en condiciones de esterilidad. Se llevó a cabo su perfusión empleando 10 ml de una solución estéril de PBS-heparina (ver 2.4.). Los corazones fueron mantenidos en solución “Hanks Balanced Salt Solution” (HBSS, Gibco) sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> (0,40 g/L KCl; 0,06 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,00 g/L NaCl; 0,35 g/L NaHCO<sub>3</sub>; 0,048 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L D-Glucosa, pH 7,4) en frío. Cada corazón fue cortado en cuatro partes, lavado con HBSS frío y transferido a un “gentleMACS C Tube” (Miltenyi Biotec GmbH) que contenía 4,7 ml de solución HBSS. Se colocaron 4 corazones por tubo, se añadieron las enzimas colagenasa Tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation) y DNasa I (Roche) a una concentración final de 600 U/ml y 0,02 U/ml, respectivamente. A continuación los corazones se procesaron para su disociación en el “Gentle MACS Dissociator” (Miltenyi Biotec GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión celular resultante fue tamizada en un filtro de 40 µm y centrifugada a 300 X g por 10 minutos. Las células resuspendidas en solución PEB (PBS pH 7,2, suplementado con 0,5% de BSA y 2 mM EDTA) frío, fueron centrifugadas 300xg por 10 minutos. Finalmente, se resuspendieron en 1 ml de solución PEB y se determinó su concentración.

A continuación, se procedió a aislar las células T CD4<sup>+</sup> por selección magnética empleando el kit “CD4 (L3T4) MicroBeads” (Miltenyi Biotec GmbH), las columnas “MACS LS (Miltenyi Biotec GmbH) y los separadores magnéticos (Miltenyi Biotec GmbH) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados fueron empleados para ensayos de citometría de flujo y proliferación celular. Para la citometría de flujo, las células fueron fijadas con PFA antes del ensayo por el método descrito en el apartado previo.

## 2.10. Obtención de infiltrado celular inflamatorio cardíaco CD4<sup>+</sup>.

La suspensión de células CD4<sup>+</sup> obtenida durante la purificación de las células T CD4<sup>+</sup> (descrito arriba en 2.9) fue colectada y centrifugada a 200 g durante cinco minutos. Las células resultantes fueron lavadas y fijadas con PFA 1%.

## 2.11. Citometría de flujo.

La detección de proteínas de superficie celular fue realizada mediante ensayos de citometría de flujo. Para ello, 2x10<sup>6</sup> células por punto fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-CD16/CD32 para bloquear los receptores Fc y evitar uniones inespecíficas. Tras dos lavados con buffer de tinción, fueron incubadas con los anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos por 20 minutos a 4°C (ver sección 1.2.1.). Después de dos lavados fueron resuspendidas en PBS para su análisis.

Para llevar a cabo el análisis de la expresión de proteínas intracelulares, FOXP3, las células previamente marcadas en su superficie con anti-CD4 y anti-CD25 acoplados a fluorocromos, fueron permeabilizadas con la solución “BD Cytfix/Cytoperm” (Bender) durante 30 minutos a 4°C. Tras dos lavados con la solución “BD Perm/Wash” fueron incubadas con anticuerpo anti-CD16/CD32 (descrito anteriormente) por 20 minutos en frío. A continuación, sin lavar, fueron teñidas con los anticuerpos anti-FOXP3-PE y su isotópico rata IgG2a-PE durante 20 minutos. Finalmente, después de dos lavados fueron resuspendidas en PBS.

Las muestras fueron analizadas en citómetro de flujo FACSCanto II (Beckton Dickinson). Los datos fueron analizados con el programa FlowJo 7.0.

## 2.12. Ensayos de proliferación celular.

Células de bazo provenientes de ratones C57BL/6 no infectados fueron purificadas (ver apartado 2.6) y después del conteo, 250.000 células por pocillo fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos en medio RPMI suplementado con 5% SFB. Así mismo, 50.000 linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados de corazón de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* (descrito en 2.9.), fueron incubadas solas o con los esplenocitos para llevar a cabo el ensayo de

proliferación celular. Las células fueron estimuladas o no con 10 µg/ml de anti-CD3 purificado y 2 µg/ml de anti-CD28. Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO<sup>2</sup>, fue añadido 1 µCi de Timidina [<sup>3</sup>H] (Amershan, Little Chalfont) por pocillo. Transcurridas 18 horas, el cultivo fue cosechado y procesado para medir la radioactividad incorporada mediante un contador de centello Microbeta “1450 MicroBeta Liquid Scintillation Counter” (Wallac Oy).

### **2.13. Análisis estadístico.**

Los datos de los ensayos *in vivo* están expresados como la media ± desviación estándar (DS) o media ± error medio estándar (EMS) de los resultados obtenidos por duplicado o triplicado y son representativos de al menos dos experimentos. Los experimentos *in vitro* fueron realizados una sola vez y las muestras ensayadas por triplicado. Los datos han sido analizados con el programa GraphPad Prism 5. Para comparar dos poblaciones empleamos la prueba estadística t Student, con la corrección de Welch cuando las varianzas eran significativamente diferentes. Para comparar la media de tres o más grupos utilizamos la prueba ANOVA de una cola y el test Kruskal-Wallis.

## IV. RESULTADOS.

### 1. SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDADOR A LA INFECCION POR *T. cruzi*.

En este trabajo hemos empleado cepas de ratón con susceptibilidad diferente a la infección por *T. cruzi* y diferentes inóculos de una cepa del parásito altamente virulenta (cepa Y) que induce una alta tasa de mortalidad en ratones susceptibles. Esta combinación nos ha permitido establecer modelos experimentales para estudiar la inmunopatogénesis de las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas experimental. Por sus características parasitológicas, estos modelos podrían ser considerados como reflejos de una infección aguda fulminante y una infección a largo plazo similar a las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en humanos, respectivamente.

#### 1.1. Modelos de infección en ratones BALB/c susceptibles a *T. cruzi*.

La cepa de ratón BALB/c ha sido descrita como susceptible a la infección por *T. cruzi*. En nuestro trabajo, la dosificación del número de parásitos inoculados, condujo a notables diferencias en la supervivencia de estos animales durante la fase aguda inicial de la infección. Grupos de 15 ratones BALB/c fueron infectados por vía intraperitoneal con los distintos inóculos de *T. cruzi*. La supervivencia de los animales fue evaluada diariamente y la parasitemia (número de tripomastigotes/ml de sangre) fue evaluada por el método de Brener, descrito en materiales y métodos. La figura 1 muestra la parasitemia de los BALB/c infectados. Se detectó un retardo en la aparición de la parasitemia con el inóculo bajo (50 parásitos/ratón). El número de tripomastigotes aumentó exponencialmente a partir de los días 5 post infección (p.i.) (inóculo alto) y 7 p.i. (inóculo bajo), observándose valores máximos entre los días 10 p.i. y 11 p.i. a partir de los cuales disminuyeron progresivamente. Con el inóculo bajo, la parasitemia fue indetectable a partir del día 35 p.i., permaneciendo así hasta el momento del sacrificio (100 d.p.i.). Con el inóculo alto, los elevados valores de parasitemia coincidieron con una elevada mortalidad de los ratones. En las curvas de supervivencia (Fig. 1), se observa que todos los ratones BALB/c infectados con el inóculo alto (2.000 parásitos/ratón) murieron durante el desarrollo de la fase aguda, mostrando 100% de mortalidad el día 20 p.i., mientras que un inóculo de parásitos cuarenta veces menor, resultó en una supervivencia del 70% de los animales (Fig.1). Sin embargo, no se encontraron

diferencias estadísticamente significativas entre los valores máximos de parasitemia de los dos grupos experimentales. Independientemente del inóculo, todos los ratones BALB/c infectados presentaron signos externos indicativos de la infección chagásica aguda, tales como pelo erizado, postración de las extremidades posteriores, pérdida del control de esfínteres y pérdida aparente de peso (no cuantificado). No obstante, el 70% de los BALB/c infectados con el inóculo bajo que sobrevivieron a la fase inicial, mostraron signos externos de recuperación.

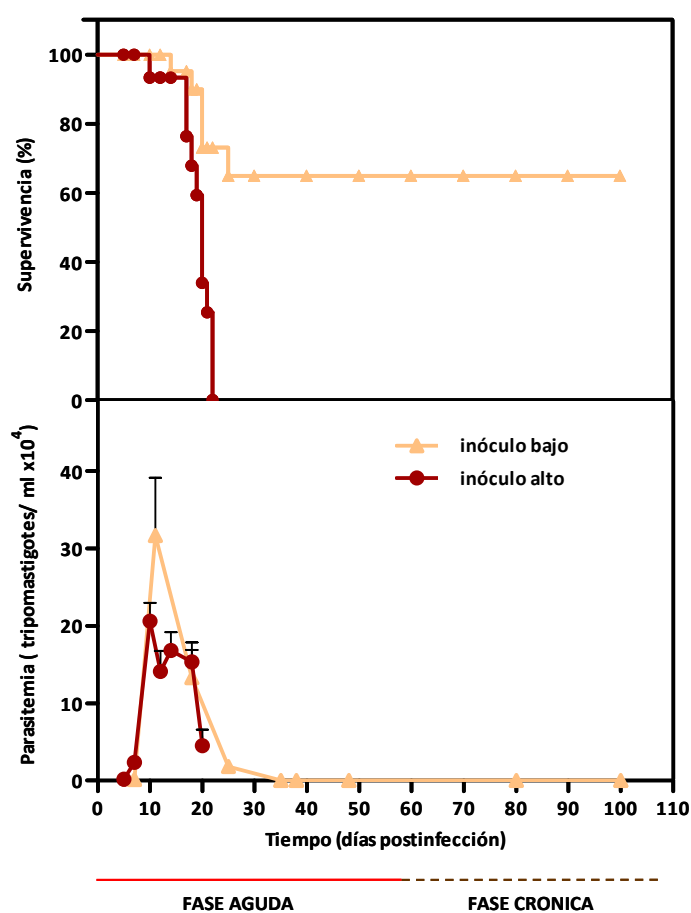


Figura 1. Evolución de la parasitemia y supervivencia en ratones BALB/c infectados con diferentes inóculos de *T. cruzi*.

Se representa la media de la parasitemia de 15 ratones por grupo ( $\pm$  EMS) determinada por el método de Brener. Los datos mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes. Gráfico inferior: Parasitemia (número de tripomastigotes/ml de sangre). Gráfico superior: Porcentaje de supervivencia.

Inóculo bajo: 50 par/ratón (▲)

Inóculo alto: 2.000 par/ratón (●)



## 1.2. Modelos de infección en ratones C57BL/6 menos susceptibles a *T. cruzi*.

En los ratones de la cepa C57BL/6, descrita como menos susceptible a la infección, la parasitemia tras los inóculos alto y bajo aumentó rápidamente a partir del día 6 y 7 p.i. respectivamente, alcanzando un máximo entre los 9 y 11 días de infección, para luego disminuir abruptamente. A diferencia de BALB/c, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los valores máximos de parasitemia (Fig. 2). En general, a partir del día 29 p.i. hasta su sacrificio a los 100 d.p.i., no se detectaron parásitos en ambos grupos de C57BL/6. Todos los ratones sobrevivieron a la infección con ambos inóculos (Fig. 2). A diferencia de la cepa susceptible, no se observaron claramente signos externos de la infección aguda en estos animales.

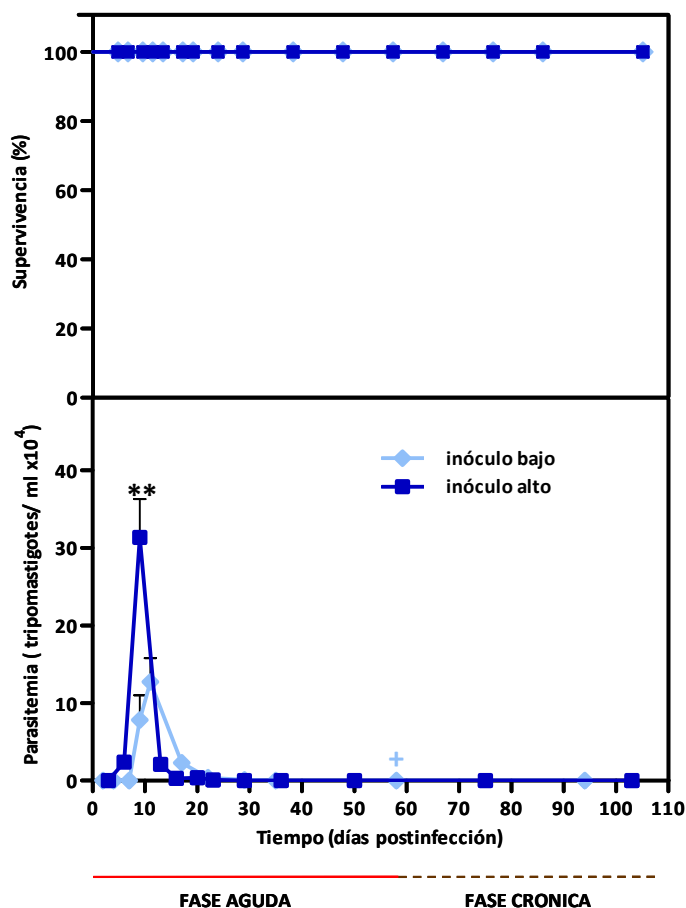


Figura 2. Evolución de la parasitemia y supervivencia en ratones C57BL/6 infectados con diferentes inóculos de *T. cruzi*

Se representa la media de la parasitemia de 15 ratones ( $\pm$  EMS) por grupo. Los asteriscos indican la diferencia significativa ( $p=0,0039$ ) entre ambos grupos de ratones el día de mayor parasitemia, t-Student. Los datos mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes. Gráfico inferior: Curvas de parasitemia. Gráfico superior: Porcentaje de supervivencia.

Inóculo bajo: 50 par/ratón (◆)

Inóculo alto: 2.000 par/ratón (■)

+ : presencia de parásitos en un ratón a los 58 d.p.i. en un experimento

### 1.3. Relación entre inóculo de parásitos, susceptibilidad del hospedador, parasitemia y carga parasitaria cardiaca.

La figura 3 muestra la parasitemia de los ratones de ambas cepas inoculados con 50 parásitos. Se observa que los ratones mas susceptibles BALB/c, presentaron valores más elevados de parásitos en sangre que los C57BL/6 durante la fase aguda. El análisis estadístico en el punto máximo de parasitemia para ambos grupos, el día 11 p.i., demostró diferencia estadísticamente significativa (t-Student,  $p=0,0269$ ).

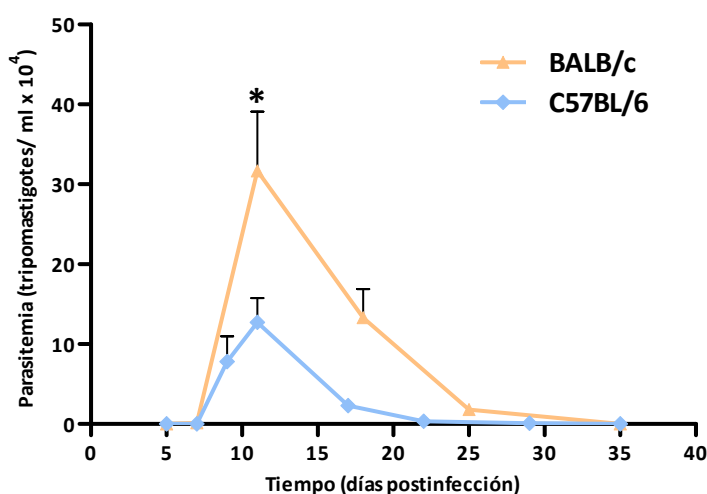


Figura 3. Comparación de la evolución de la parasitemia en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con el inóculo bajo (50 par/ratón).

Se representa la media de la parasitemia de 15 ratones ( $\pm$  EMS) por grupo. El asterisco indica la diferencia significativa ( $p<0,05$ ), t-Student comparando los valores entre BALB/c y C57BL/6 en el día de mayor parasitemia.

El cardiotropismo de la cepa Y de *T. cruzi*, ampliamente descrito en la literatura, fue evaluado en nuestra investigación a fin de relacionar la carga parasitaria cardiaca con la severidad de la respuesta inflamatoria inducida en este órgano, en las diferentes condiciones experimentales. Los ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con los distintos inóculos fueron sacrificados a diferentes días post infección durante la fase aguda. En experimentos preliminares con evaluación semanal observamos que las diferencias en carga parasitaria, expresión génica de marcadores de inflamación y reclutamiento leucocitario cardiaco, en ambas cepas de ratón, se produjeron en la segunda y tercera semana post infección, por lo que nos propusimos en adelante estudiar en profundidad los distintos parámetros restringiéndonos a esta ventana temporal, con una frecuencia de 5 días, en concreto a los 7, 12, 17 y 22 días p.i. Para ello, los corazones extraídos fueron perfundidos con una solución

de PBS-heparina a fin de eliminar la sangre y los tripomastigotes circulantes, de forma que el ADN de *T. cruzi* detectado fuera de la forma replicativa intracelular del parásito, el amastigote. Mediante ensayos de PCR Multiplex seguidos por electroforesis en gel de agarosa, hicimos una interpretación cualitativa del ADN del parásito presente en el corazón (Fig. 4A). Los ratones BALB/c mostraron mayor intensidad de bandas amplificadas que los C57BL/6, además, se observaron niveles altos de carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con inóculo bajo en los días 12, 17 y 22 p.i., mientras que en los ratones C57BL/6 se observaron únicamente en los días 12 y 17 post infección.

La determinación cuantitativa del ADN de *T. cruzi* mediante ensayos de PCR a tiempo real con la apropiada curva estándar (Fig. 4B), mostró que los ratones BALB/c susceptibles a la infección, presentaron valores mas elevados de carga parasitaria (ng ADN *T. cruzi*/ mg tejido cardiaco) que los C57BL/6. En ambas cepas de ratón, la infección con un inóculo mayor produjo un aumento significativo de la carga parasitaria en los días 7 y 12 post infección. En los ratones BALB/c se observó un crecimiento exponencial de la carga parasitaria desde el día 7 al 17 p.i. independientemente del inóculo empleado. Sin embargo, los niveles de parásitos fueron significativamente mayores (cerca de 2 log al día 17) en los BALB/c infectados con el inóculo alto. En los BALB/c supervivientes del inóculo bajo, no hubo variaciones en los valores de carga parasitaria entre los días 17 y 22 p.i., (Fig. 4B, BALB/c). En los C57BL/6 (inóculo alto), observamos una dinámica diferente, ya que, tras aumentar exponencialmente la carga parasitaria entre los días 7 y 12 p.i., disminuyó abruptamente en los días posteriores indicativo probablemente de una eliminación de la infección (Fig. 4B). Con el inóculo más bajo la mayor carga parasitaria se observó hasta el día 17 p.i. para luego disminuir, alcanzando el día 22 p.i. un valor similar a los infectados con el inóculo alto (Fig. 4B, C57BL/6).

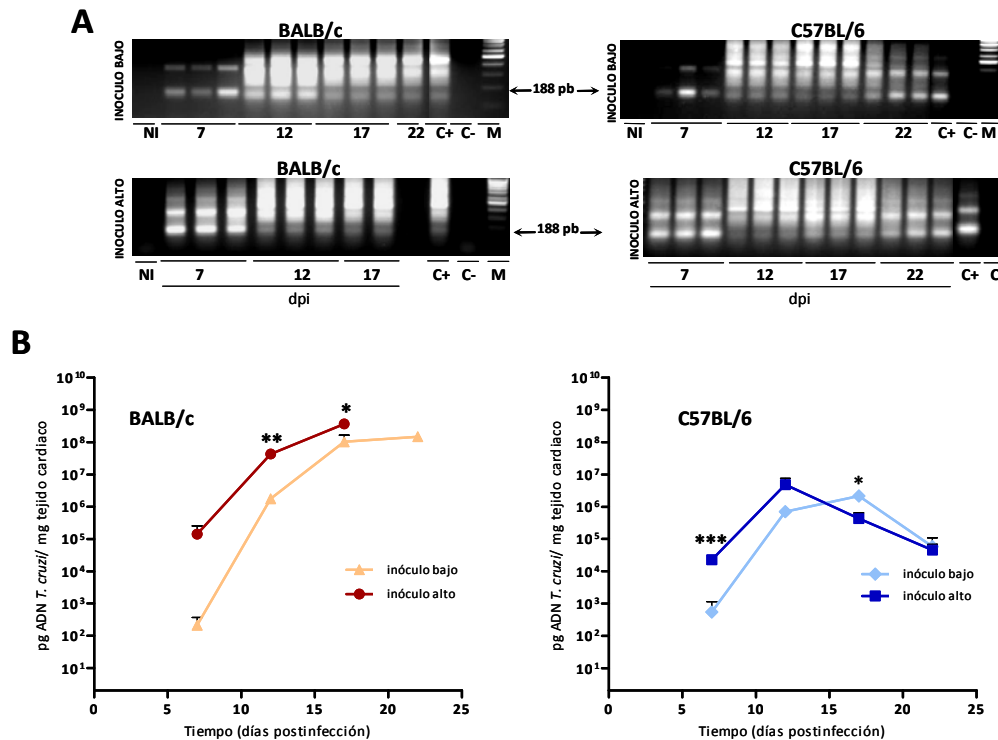


Figura 4. Invasión de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 durante la fase aguda de la infección.

A) PCR Multiplex basado en la detección de ADN de *T. cruzi*. Se emplearon las sondas TCZ1, TCZ2, TCZ3 y TCZ4. 100 ng de ADN total/reacción fueron amplificados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio (n=3 ratones infectados/día). El producto esperado tiene entre 166 y 188 pb, no obstante, al ser las secuencias amplificadas muy repetitivas, también se amplifican fragmentos de mayor longitud formando una escalera; B) Cuantificación de la carga parasitaria (ADN de *T. cruzi*) mediante PCR a tiempo real. 40-100 ng de ADN total/reacción fueron amplificados por triplicado. n=3 ratones/día.

NI: ratón no infectado; d.p.i.: días post infección; M: marcador de peso molecular (escalera 100 pb); C-: control negativo (reacción de amplificación sin ADN); C+: control positivo (ratón infectado en fase aguda); \*: P = 0,01 a 0,05; \*\* P = 0,001 a 0,01; \*\*\* P < 0,0001 entre inóculos bajo y alto.

#### 1.4. Nidos de amastigotes intracelulares en el tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 en la fase aguda de la infección.

Cortes de tejido de muestras cardiacas tomadas a los 12 d.p.i. en ambas cepas de ratón fueron teñidos con hematoxilina-eosina y examinados al microscopio óptico para detectar amastigotes *in situ*. Como podemos observar, en la primera etapa de la infección (fase aguda) ambas cepas de ratón mostraron nidos de amastigotes de gran tamaño (Fig. 5, A y B). Sin embargo, el número de nidos en el tejido de los ratones BALB/c fue mayor que en los C57BL/6 (Fig. 5, A y B) en todos los cortes analizados.

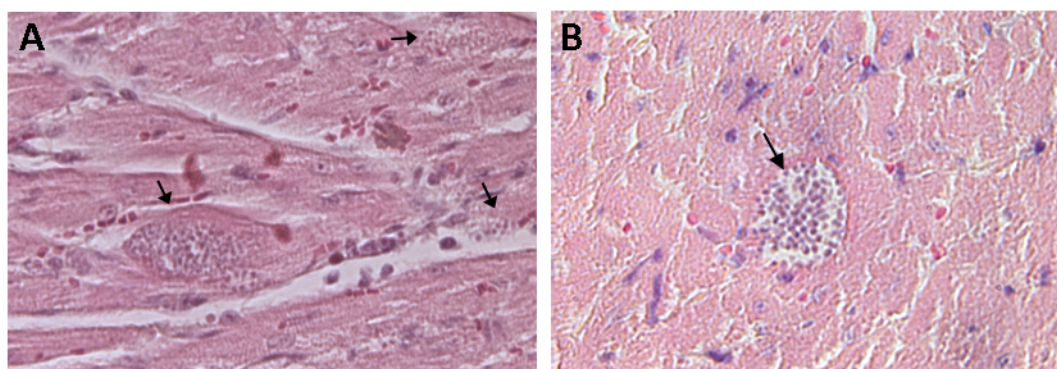


Figura 5. Estudio histológico de cortes de tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con inóculo 2.000 par/ratón de *T. cruzi*, en fase aguda (día 12 p.i.). A. Ratones BALB/c. B) Ratones C57BL/6. Las flechas señalan los nidos de amastigotes. Nótese la microfibrila distendida debido a los parásitos en su interior. Tinción con hematoxilina & eosina. 630x. Micrografía representativa de todos los cortes realizados.

## 2. RESPUESTA INMUNOLOGICA EN ORGANOS LINFoidES DURANTE LA INFECCION AGUDA POR *T. cruzi*.

### 2.1. Citoquinas sistémicas durante la fase aguda de la infección.

Se analizó la presencia y concentración sistémica de nueve citoquinas representativas de respuestas Th1/Th2/Th17 inflamatorias y antiinflamatorias en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados. Los niveles en suero de las citoquinas no variaron significativamente entre las 2 cepas BALB/c y C57BL/6 infectados con inóculo bajo debido a la gran variabilidad en las varianzas a excepción de IL-6 (Tablas 1 y 2, Fig. 6). Como se puede apreciar, ambas cepas de ratón mostraron niveles crecientes de citoquinas en esta primera etapa de la infección. La infección produjo en BALB/c un incremento muy importante de los niveles de IFN- $\gamma$  coincidiendo con el pico de parasitemia y de IL-6 al final de la fase aguda. También se pudo observar una disminución de IL-10, previamente descrita (Zhang & Tarleton, 1996), coincidente con la evolución de la parasitemia que luego se recupera. Asimismo, TNF- $\alpha$  y GM-CSF presentan una cinética similar. IL-17 parece aumentar al final de la fase aguda. Sin embargo, la elevada dispersión de las muestras no permitió obtener significación estadística en ningún caso (Tabla 1).

En ratones C57BL/6 la infección con inóculo bajo produjo asimismo un incremento de IFN- $\gamma$  coincidente con la parasitemia (Tabla2). Sin embargo, en estos animales el patrón

cinético de citoquinas fue muy diferente. No se observa disminución de IL-2 y TNF- $\alpha$  y GM-CSF. Por otro lado, IL-6 aumentó coincidente con la parasitemia, mientras que IL-10 aumentó considerablemente al final de la fase aguda coincidente con la recuperación (Tabla 2).

**TABLA 1.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones BALB/c

Inóculo: 50 parásitos/ratón

Evaluación en fase aguda°

Citoquina	Concentración media $\pm$ EMS (pg/ml) a diferentes días post infección			
	NI	7	12	17
IFN- $\gamma$	6 $\pm$ 4	32 $\pm$ 19	14.273 $\pm$ 3.471	904 $\pm$ 194
TNF- $\alpha$	20 $\pm$ 12	10 $\pm$ 10	0	43 $\pm$ 25
IL-2	127 $\pm$ 50	57 $\pm$ 57	9 $\pm$ 9	155 $\pm$ 83
IL-4	4 $\pm$ 4	3 $\pm$ 3	0	26 $\pm$ 16
IL-5	17 $\pm$ 9	12 $\pm$ 10	17 $\pm$ 6	39 $\pm$ 11
IL-6	121 $\pm$ 20	114 $\pm$ 33	277 $\pm$ 10	946 $\pm$ 93
IL-10	5 $\pm$ 4	0	0	21 $\pm$ 14
GM-CSF	65 $\pm$ 22	32 $\pm$ 31	0	86 $\pm$ 48
IL-17	6 $\pm$ 4	3 $\pm$ 3	0	30 $\pm$ 18

° Etapa inicial de la infección, hasta 60 d.p.i

NI: controles no infectados

Número de ratones por grupo experimental = 3

**TABLA 2.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6

Inóculo: 50 parásitos/ratón

Evaluación en fase aguda°

Citoquina	Concentración media $\pm$ EMS (pg/ml) a diferentes días post infección				
	NI	7	12	17	22
IFN- $\gamma$	0	6 $\pm$ 4	3.437 $\pm$ 641	461 $\pm$ 113	237 $\pm$ 26
TNF- $\alpha$	0	0	3 $\pm$ 3	20 $\pm$ 14	0
IL-2	4 $\pm$ 2	49 $\pm$ 22	44 $\pm$ 41	84 $\pm$ 44	11 $\pm$ 8
IL-4	0	0	0,43 $\pm$ 0,43	0	0
IL-5	9 $\pm$ 3	10 $\pm$ 3	35 $\pm$ 7	32 $\pm$ 17	38 $\pm$ 15
IL-6	63 $\pm$ 25	141 $\pm$ 21	252 $\pm$ 35	185 $\pm$ 14	94 $\pm$ 49
IL-10	0	0	0,91 $\pm$ 0,9	115 $\pm$ 73	153 $\pm$ 92
GM-CSF	0	18 $\pm$ 11	23 $\pm$ 23	29 $\pm$ 24	0
IL-17	0	0	7 $\pm$ 7	24 $\pm$ 16	41 $\pm$ 24

° Etapa inicial de la infección, hasta 60 d.p.i

NI: controles no infectados

Número de ratones por grupo experimental = 3

**TABLA 3.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones BALB/c  
Inóculo: 2.000 parásitos/ratón  
Evaluación en fase aguda<sup>o</sup>

Citoquina	Concentración media $\pm$ EMS (pg/ml) a diferentes días post infección			
	NI	7	12	17
IFN- $\gamma$	0	1.464 $\pm$ 135	3.163 $\pm$ 267*	308 $\pm$ 98
IL-2	0	69 $\pm$ 33	24 $\pm$ 24	0
IL-5	0	0	11 $\pm$ 5*	0
IL-6	0	77 $\pm$ 30	144 $\pm$ 15	891 $\pm$ 287*
IL-17	0	24 $\pm$ 9	6 $\pm$ 6	0
TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 y GM-CSF = 0				

<sup>o</sup> Etapa inicial de la infección, hasta 60 d.p.i

NI controles no infectados

Nº de ratones por grupo experimental

P < 0,05, Anova de una cola y test Kruskal-Wallis, comparado al grupo control no infectado

**TABLA 4.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6  
Inóculo: 2.000 parásitos/ratón  
Evaluación en fase aguda<sup>o</sup>

Citoquina	Concentración media $\pm$ ES (pg/ml) a diferentes días post infección				
	NI	7	12	17	22
IFN- $\gamma$	0	785 $\pm$ 179	2.664 $\pm$ 694**	327 $\pm$ 49	204 $\pm$ 27
IL-5	3 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3*	7 $\pm$ 3
IL-6	17 $\pm$ 7	54 $\pm$ 12	252 $\pm$ 51*	100 $\pm$ 11	50 $\pm$ 13
TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 y GM-CSF = 0					

<sup>o</sup> Etapa inicial de la infección, hasta 60 d.p.i

NI: controles no infectados

Número de ratones por grupo experimental = 3

\* P Anova de una cola y test Kruskal-Wallis, comparado al grupo control no infectado

Al comparar los valores de ambas cepas de ratón con inóculo bajo se observó una mayor producción de IFN- $\gamma$  e IL-6 en los ratones BALB/c respecto a los C57BL/6 a los 12 y 17 d.p.i., respectivamente (Fig. 6, A y B). Sin embargo, los C57BL/6 presentaron mayor concentración de IL-10 a partir de los 17 d.p.i. que los BALB/c (Fig. 6C). Sorprendentemente, los ratones con inóculo alto presentaron valores de IFN- $\gamma$  parecidos entre ambas cepas de ratón (Fig. 6D), y aproximadamente 5 veces menores que los observados en los ratones BALB/c con el inóculo bajo (Fig. 6A), mientras que los valores de IL-6 (Fig. 6E) fueron parecidos a los del inóculo bajo en ambas cepas de ratón, siendo mayores para los ratones BALB/c.

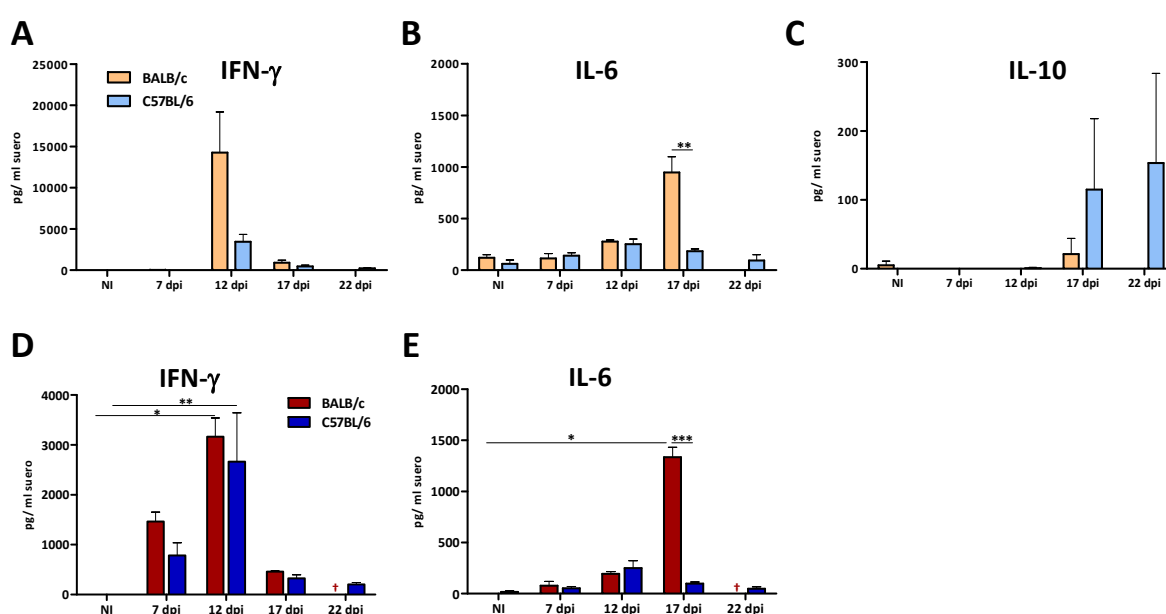


Figura 6. Niveles de citoquinas Th1/Th2 en suero de ratones infectados, evaluados durante la fase aguda.

A) Concentración de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 50 parásitos. B) Concentración de IL-6 en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 50 parásitos. C) Concentración de IL-10 en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 50 parásitos. D) Concentración de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 2.000 parásitos. E) Concentración de IL-6 en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 2.000 parásitos. Se representa la media  $\pm$  (EMS). La barra y el (los) asteriscos indican la significación estadística entre: 1- ratones infectados con respecto a no infectados de la misma cepa: Anova: 1 cola, aproximación Gaussiana ( $P < 0,05$ ); 2- ratones BALB/c y C57BL/6 infectados: t-Student ( $P < 0,05$ ), \*:  $P = 0,01$  a  $0,05$ ; \*\*  $P = 0,001$  a  $0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$ .

## 2.2. Supresión de la producción de citoquinas en bazo de ratones infectados en fase aguda.

Previo a la evaluación de las citoquinas Th1, Th2 y Th17 en el bazo de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados, determinamos las poblaciones celulares presentes en este órgano linfoide durante la infección aguda. Para ello, las células del bazo de ratones no infectados e



infectados con 2.000 tripomastigotes, fueron obtenidas y evaluadas mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la figura 7. Como resultado de la infección aguda, ambas cepas de ratón presentaron esplenomegalia, siendo más evidente en los ratones más susceptibles a *T. cruzi* (datos no mostrados). Como resultado de la esplenomegalia, todas las poblaciones celulares aumentaron. Sin embargo, al normalizar por porcentaje del total, al comparar el bazo de ratones no infectados con el infectado, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4 (CD4), T CD8 (CD8) y de células B (CD45-B220) durante la infección aguda y por el contrario, un aumento en el porcentaje de macrófagos (CD11b) y células dendríticas (CD11c) en ambas cepas (Fig. 7, A y B).

En la figura 7C observamos que en el bazo de ratones BALB/c infectados, las células B representaron la población celular más abundante ( $117 \times 10^6$ ), seguida por linfocitos T CD4 ( $58 \times 10^6$ ), macrófagos ( $47 \times 10^6$ ), células dendríticas ( $43 \times 10^6$ ) y en menor cantidad los linfocitos T CD8 ( $30 \times 10^6$ ). Mientras que en C57BL/6 (Fig. 7D) los macrófagos fueron la población celular predominante ( $64 \times 10^6$ ), seguida por un número similar de linfocitos T CD4 ( $47 \times 10^6$ ) y células B ( $48 \times 10^6$ ) y en menor cantidad los linfocitos T CD8 ( $29 \times 10^6$ ) así como células dendríticas ( $23 \times 10^6$ ). Es de destacar que el número total de células fue mucho mayor en los bazos de animales BALB/C infectados ( $408 \times 10^6$ ) que en los C57BL/6 infectados ( $255 \times 10^6$ ), aunque el aumento en el número de células fue proporcionalmente mayor en ratones C57BL/6 infectados.

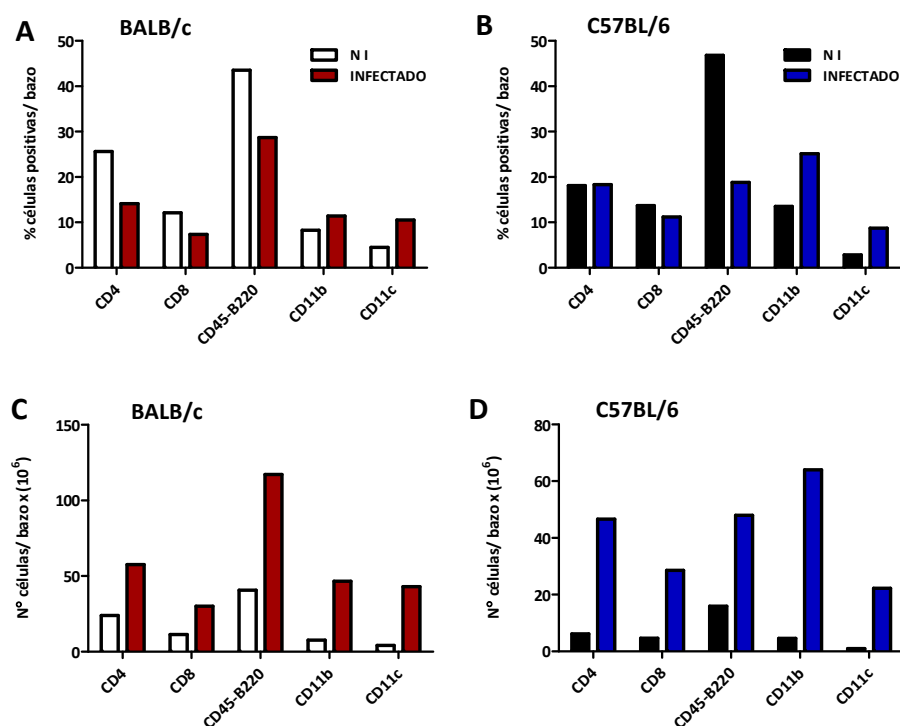


Figura 7. Poblaciones leucocitarias presentes en bazo de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 2.000 parásitos analizados mediante citometría de flujo.

A) Porcentaje de las subpoblaciones celulares positivas en bazo de ratones BALB/c. B) Porcentaje de las subpoblaciones celulares positivas en bazo de ratones C57BL/6. C) Número total de células por bazo de ratón BALB/c. D) Número total de subpoblaciones por bazo de ratón C57BL/6. Se preparó una suspensión celular a partir de un pool de bazo de cada grupo experimental, el número medio de células por bazo fue BALB/C NI:  $93 \times 10^6$ , BALB/C infectado:  $408 \times 10^6$ , C57BL/6 NI:  $34 \times 10^6$ , C57BL/6 infectado:  $255 \times 10^6$ .

La figura 8 muestra la evaluación de las citoquinas presentes en el sobrenadante de cultivo de células T aisladas de bazo de ratones BALB/c y estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Estos estímulos activan exclusivamente a los linfocitos T. Los valores de concentración de las citoquinas presentes en el cultivo de células de los bazo controles (no infectados) procesadas los mismos días 7, 12 y 17 p.i. fueron muy similares, por lo que en cada gráfica representamos el promedio de los mismos  $\pm$  desviación estándar (DS). En general, se observó una disminución gradual en la producción de las citoquinas IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17 en los esplenocitos infectados desde el día 7 al 17 p.i. y por el contrario un aumento en la producción de IL-4. Las concentraciones de IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-6 no mostraron diferencias con respecto a los esplenocitos de ratones no infectados aunque en el primer caso los valores fueron tan elevados que alcanzaron el valor máximo de saturación del sistema (Fig. 8).

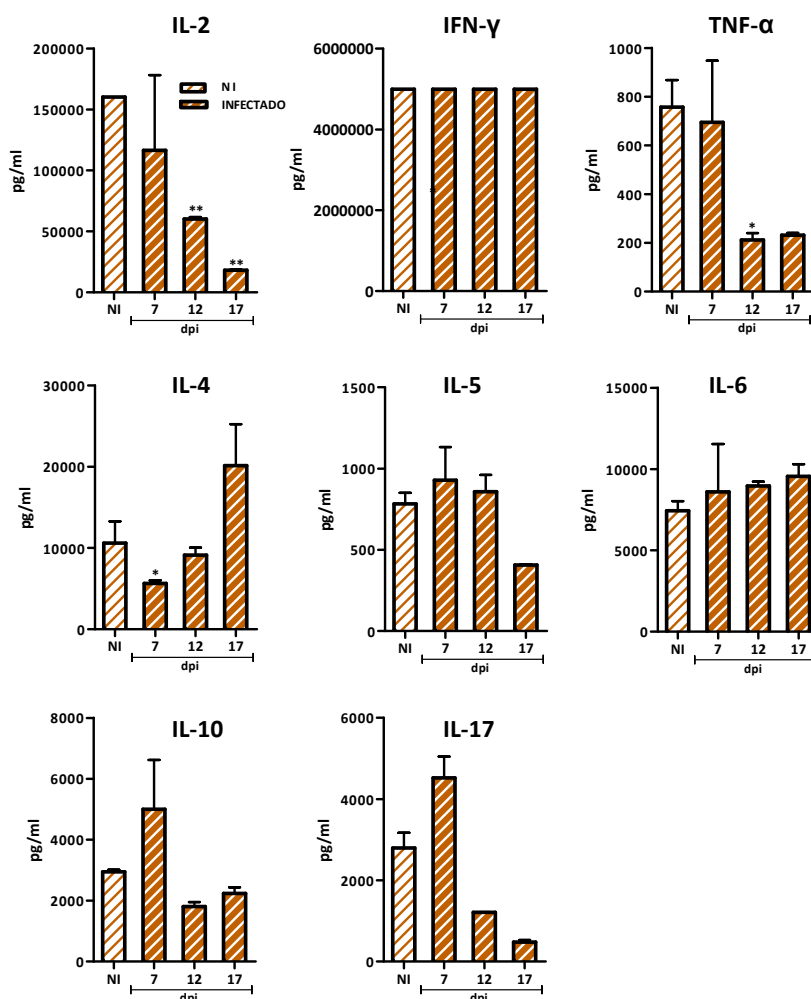


Figura 8. Producción *in vitro* de citoquinas Th1/Th2/Th17 por células T de bazo de ratones BALB/c en fase aguda, infectados con el inóculo alto.

Los esplenocitos fueron cultivados en medio RPMI 5% SFB y estimulados con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Los sobrenadantes del cultivo fueron colectados a las 72 horas para determinar la concentración de citoquinas mediante citometría de flujo. Se representa la media  $\pm$  (DS). El (los) asterisco(s) indica la diferencia estadística entre no infectados e infectados, t-Student,  $P < 0,05$ .

La evaluación de las citoquinas presentes en el sobrenadante de cultivo de células esplénicas aisladas de ratones C57BL/6 se muestra en la figura 9. Al igual que en los BALB/c, los valores de concentración de las citoquinas producidas por linfocitos T presentes en el cultivo de células de los bazos controles procesadas los días 7, 12, 17 y 22 fueron muy similares, por lo que se representa el promedio de los mismos  $\pm$  (DS). En general, en el bazo de los ratones C57BL/6 infectados se observó una marcada inhibición en la producción de las citoquinas: IL-2, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17, durante los días 12 y 17 de infección y luego un incremento de su producción el día 22 p.i. al compararlos con el grupo control. La supresión en el IFN-γ se observó desde el primer día de evaluación (7 p.i.), luego aumentó el

día 12 p.i., indicativo de la recuperación de la infección, y a continuación mostró una disminución en su producción el resto de los días evaluados (17 y 22 p.i.) (Fig. 9).

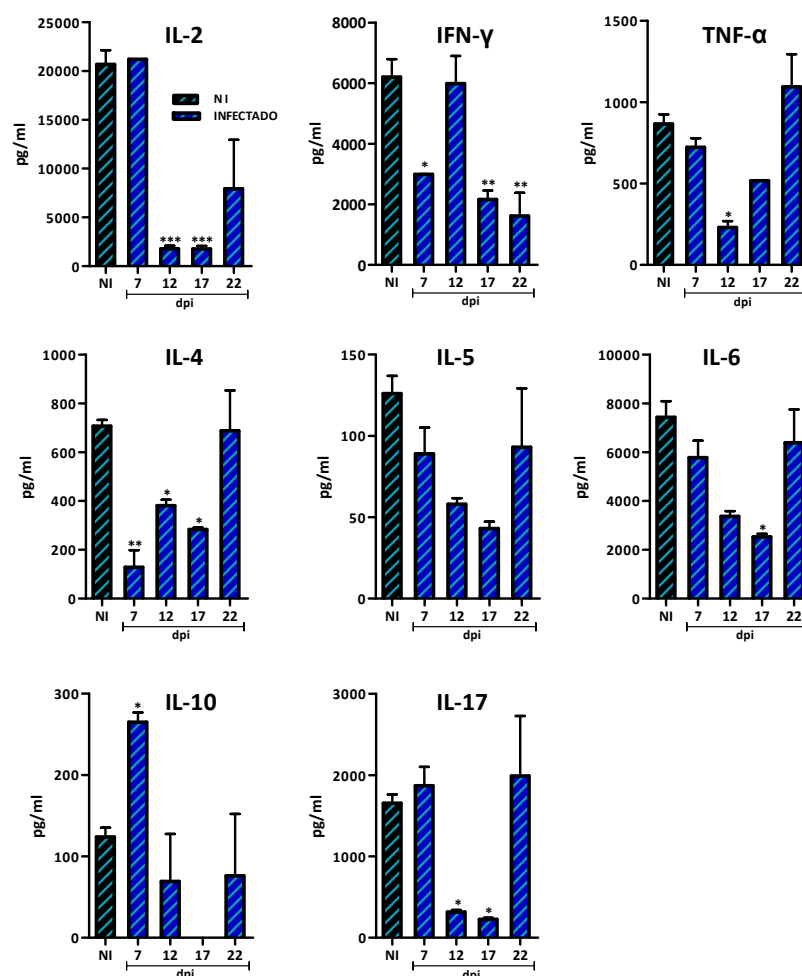


Figura 9. Producción *in vitro* de citoquinas Th1/Th2/Th17 por células T de bazo de ratones C57BL/6 en fase aguda, infectados con el inóculo alto.

Los esplenocitos fueron cultivados en medio RPMI 5% SFB y estimulados con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Los sobrenadantes del cultivo fueron colectados a las 72 horas para determinar la concentración de citoquinas mediante citometría de flujo. Se representa la media  $\pm$  (DS). El (los) asterisco (s) indica la diferencia estadística entre no infectados e infectados, t-Student,  $P < 0,05$ .

### 2.3. Estudio inmunológico del timo.

Dado que el timo es el órgano linfoide productor de células T reg con fenotipo  $CD4^+CD25^+$  con actividad supresora de la respuesta inmune (Sakaguchi et al., 1995), nos propusimos evaluar las poblaciones de células T CD4 y TCD8 presentes en este órgano, así como los marcadores de células T reg en nuestros modelos experimentales.

### 2.3.1. Atrofia tímica severa en respuesta a la infección por *T. cruzi*.

Las células obtenidas del pool de timos de cada grupo experimental de ratones BALB/c y C57BL/6, no infectados e infectados con los inóculos bajo y alto de *T. cruzi*, fueron cuantificadas para determinar el número total de células por órgano, a los días 12 y 17 post infección. Posteriormente fueron analizadas mediante citometría de flujo. En la figura 10 se muestra el número total de células por timo en ratones no infectados e infectados. En ambas cepas de ratón se observó una disminución del número total de células a los 12 d.p.i., disminución que fue mayor al bajar el inóculo. A los 17 días los ratones de ambas cepas mostraron una reducción en la celularidad del timo de aproximadamente 6 veces (Fig. 10). La atrofia tímica fue evidenciada a los 17 d.p.i. visualmente durante la disección de los animales (no mostrado). En los BALB/c el número de timocitos por órgano a los 17 d.p.i. fue igual con los dos inóculos empleados (Fig. 10B), mientras que en los C57BL/6 el valor fue más elevado con el inóculo alto (Fig. 10 B).

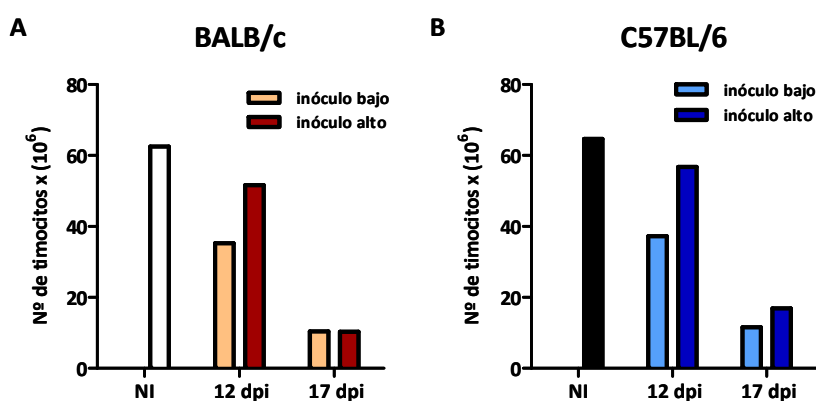


Figura 10. Número total de células por timo de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 50 y 2.000 tripomastigotes, durante los días 12 y 17 de la fase aguda.

A) Timo de ratones BALB/c no infectados (NI) e infectados. B) Timo de ratones C57BL/6 no infectados (NI) e infectados. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes de cada grupo experimental.

Las diferentes poblaciones de timocitos fueron analizados mediante citometría de flujo y se muestran en la figura 11. Los porcentajes de células doble positivas (DP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, mostraron una disminución a los 17 d.p.i., que fue mayor con el inóculo alto que con el bajo en ambas cepas de ratón. Cabe mencionar que esta disminución porcentual de células DP a

17 d.p.i. fue menor en el timo de los ratones C57BL/6 que en BALB/c inoculados con el inóculo bajo.

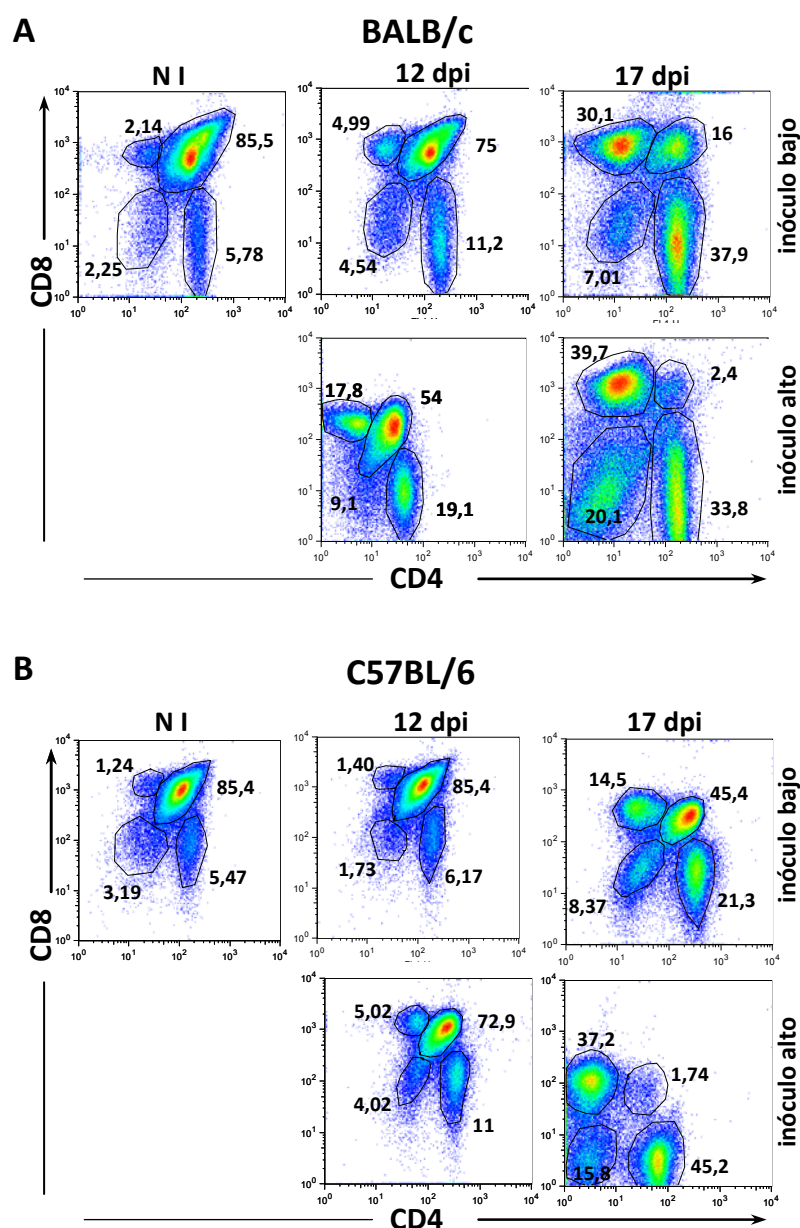


Figura 11. Análisis mediante citometría de flujo de los tipos de linfocitos T CD4 y T CD8 presentes en el timo de ratones infectados en fase aguda.

A) Timo de ratones BALB/c no infectados (NI) e infectados. B) Timo de ratones C57BL/6 no infectados (NI) e infectados. Los números indican los porcentajes de células positivas de cada población: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes de cada grupo experimental.

El número de células T CD4<sup>+</sup> simple positiva (SP) por timo se muestra en la figura 12. Observamos que a los 12 y 17 d.p.i no hubo variación en el número de células T CD4<sup>+</sup> SP en el timo de los BALB/c y C57BL/6 con el inóculo bajo (Fig. 12, A y B). Sin embargo al

incrementar el inóculo de parásitos, en los BALB/c el número de células T CD4<sup>+</sup> SP aumentó con respecto al timo no infectado y a los 17 d.p.i. disminuyó abruptamente (Fig. 12A). Mientras que en los C57BL/6 con el inóculo alto, se observa un incremento progresivo del número de células T CD4<sup>+</sup> SP en los timos infectados, siendo el doble de los del timo control a los 17 d.p.i. (Fig. 12B).

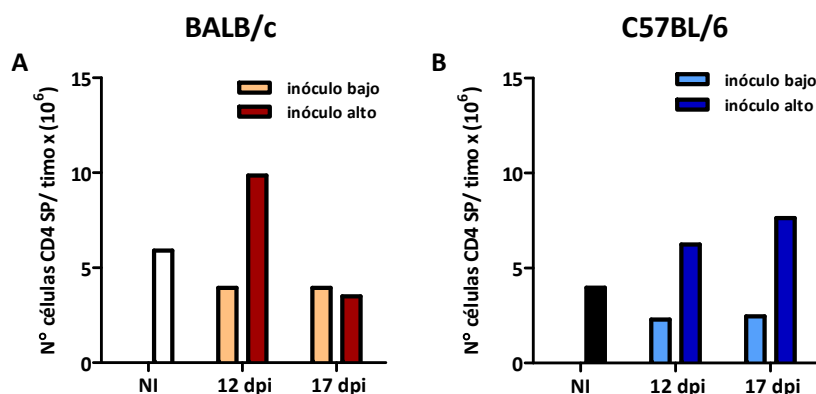


Figura 12. Número de células T CD4<sup>+</sup> simple positiva por timo de ratones BALB/c y C57BL/6.

A) Timo de ratones BALB/c. B) Timo de ratones C57BL/6. El número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> SP/órgano fue calculado multiplicando el porcentaje de células positivas por el número de timocitos/timo de cada grupo experimental. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

### 2.3.2. Incremento de células T reguladoras naturales en el timo de ratones C57BL/6 con la infección.

La población de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fue analizada en el timo de los animales experimentales mediante citometría de flujo. Una vez seleccionada esta población se determinó el porcentaje de células positivas para los marcadores FOXP3, FR4, CTLA-4 y GITR. Los resultados característicos de células T reg mostrados en la figura 13 corresponden a la evaluación de los timos de ratones BALB/c infectados con 2.000 parásitos (inóculo alto) a los 12 y 17 d.p.i. Los ratones no infectados presentaron un porcentaje medio de 0,44% de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y se observó un incremento en el timo de los ratones infectados de 1,35% y 2,42% a 12 y 17 d.p.i. respectivamente (Fig. 13A). En la figura 13B se muestran los porcentajes de las poblaciones de células T reg CD4 CD25 positivas para los marcadores FOXP3, FR4, CTLA-4 y GITR (Fig. 13B). En general no detectamos diferencias en la expresión de los marcadores más aceptados de células T reg como FOXP3 y GITR. Sin embargo detectamos un ligero aumento de FR4 y sobre todo de CTLA-4 en un porcentaje de las células T reg procedente de los ratones 12 d.p.i. y 17 d.p.i.

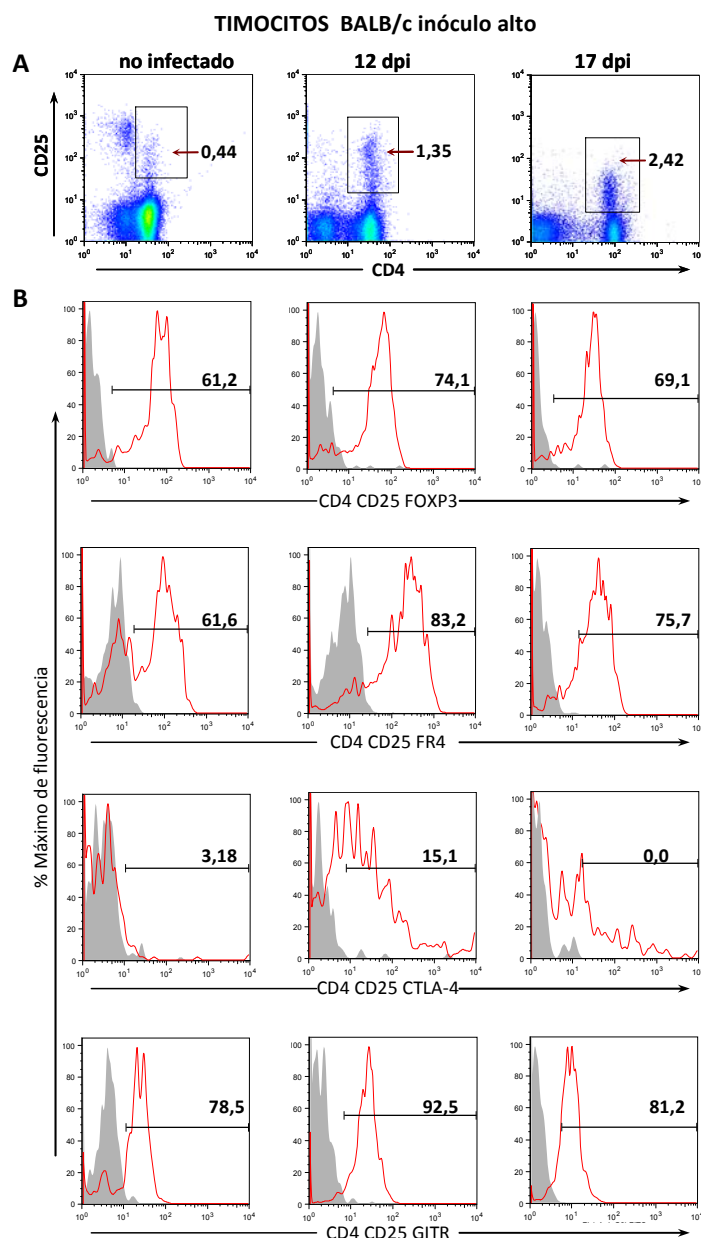


Figura 13. Subpoblaciones celulares asociadas a los linfocitos T reguladores en el timo de ratones BALB/c inoculados con 2.000 parásitos, en fase aguda.

A) Porcentaje de células T  $CD4^+ CD25^+$  en el timo. B) Porcentaje de células T  $CD4^+ CD25^+$  positivas para los marcadores FOXP3, FR4, CTLA-4 y GITR en timo.

El análisis de las células T reg del timo en ratones C57BL/6 inoculados con 2.000 parásitos también fue llevado a cabo (Fig. 14). El porcentaje de células T reg  $CD4^+ CD25^+$  resultó mas bajo en el timo del grupo no infectado (0,24%) respecto a BALB/c aumentando en los infectados a 1,5% y 3,22% a los 12 y 17 d.p.i, respectivamente (Fig. 14A). El análisis de los marcadores de células T reg en comparación con el grupo control reflejó un incremento



de los marcadores FOXP3, GITR y FR4. Sin embargo, las células T reg de C57BL/6 no parecen expresar CTLA-4 a diferencia de BALB/C. (Fig. 14B).

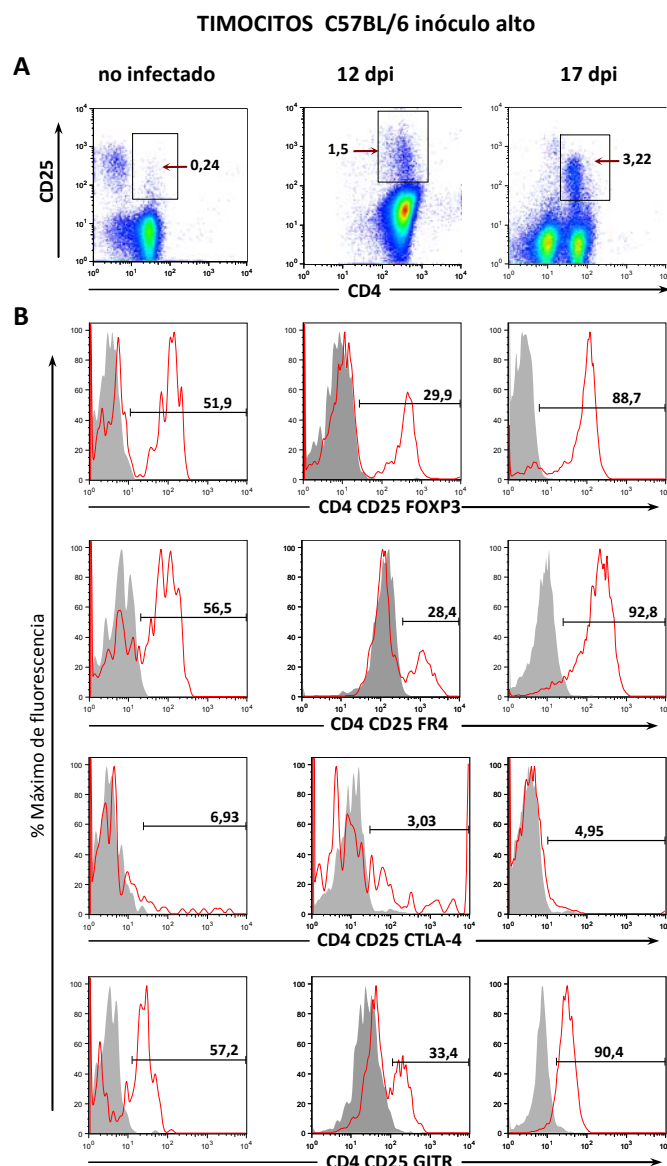


Figura 14. Evaluación de las poblaciones celulares asociadas a los linfocitos T reguladores en el timo de ratones C57BL/6 inoculados con 2.000 parásitos, en fase aguda.

A) Porcentaje de células T  $CD4^+ CD25^+$  en el timo. B) Porcentaje de células T  $CD4^+ CD25^+$  positivas para los marcadores FOXP3, FR4, CTLA-4 y GITR en timo.

A continuación quisimos determinar el número total de células/timo que correspondía a los porcentajes de linfocitos T  $CD4^+ CD25^+$  hallados. El resultado se muestra en la figura 15A. Podemos observar en ambas cepas un aumento en el número total de células con respecto al timo no infectado, sin embargo, en los BALB/c los valores tienden a disminuir levemente conforme avanza la infección, mientras que en los C57BL/6 aumentan abruptamente (17 d.p.i). Los valores obtenidos en los BALB/c fueron mayores que en los

C57BL/6 a día 12 p.i., mientras que a día 17 p.i. ocurrió lo contrario, mostrándose mas elevados en la cepa menos susceptible (C57BL/6) para todas los marcadores evaluados. Así mismo, el número total de linfocitos T  $CD4^+ CD25^+$  positivas para los marcadores FOXP3, FR4, CTLA-4 y GITR por timo fue determinado (Fig. 15, B y C).

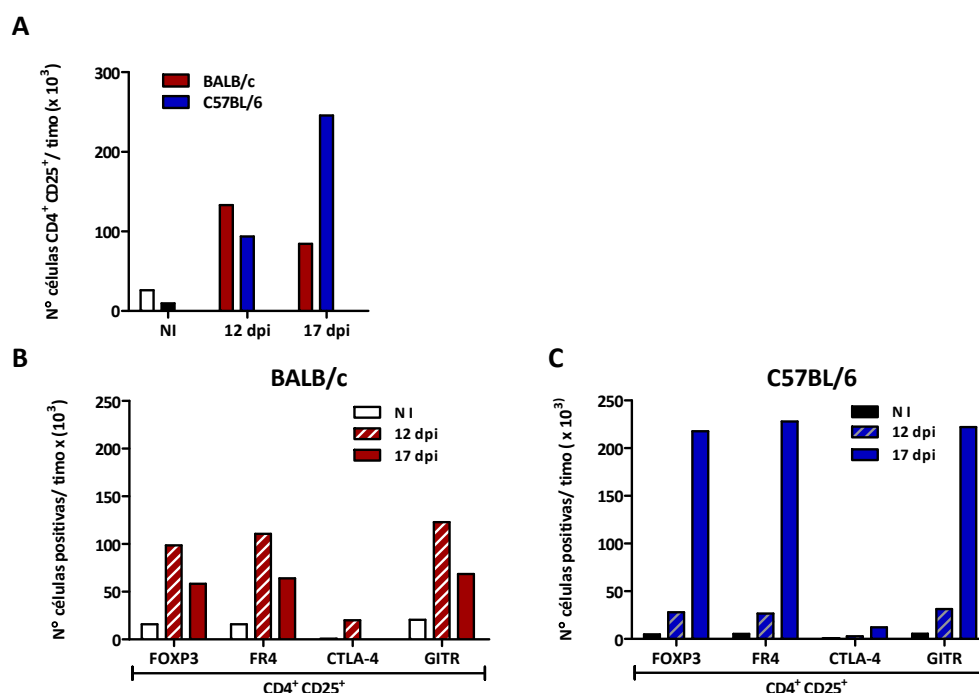


Figura 15. Número de células T reg en el timo de ratones infectados con 2.000 parásitos.

A) Número de células T  $CD4^+ CD25^+$  por timo en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados. B) Número de células T  $CD4^+ CD25^+$  positivas para los marcadores de células T reg por timo de ratones BALB/c. C) Número de células T  $CD4^+ CD25^+$  positivas para los marcadores de células T reg por timo de ratones C57BL/6.

A fin de comparar el efecto del inóculo de parásitos en la respuesta del timo de los ratones menos susceptibles, C57BL/6 a la infección por *T. cruzi*, llevamos a cabo el análisis el día 17 p.i. de las poblaciones T  $CD4^+ CD25^+$  y de los marcadores de células T reg, en ratones inoculados con 50 parásitos (inóculo bajo). El número de células totales/timo a día 17 p.i. con los inóculos bajo y alto fue  $11,54 \times 10^6$  y  $16,88 \times 10^6$ , respectivamente (Fig. 10B). La figura 16 muestra que el porcentaje de células T  $CD4^+ CD25^+$  en el timo de C57BL/6 inoculados con 50 parásitos fue 1,17% (Fig. 16A), es decir, 2,75 veces menos que el valor encontrado en el timo de los C57BL/6 inoculados con 2.000 parásitos (3,22%) (Fig. 14A). El valor absoluto de células/timo T  $CD4^+ CD25^+$  se muestra en la figura 16B. Como se observa en la figura 16C, los porcentajes de las poblaciones de marcadores asociados a células T  $CD4^+ CD25^+$ : FOXP3, FR4 y CTLA-4, fueron 62,4%; 68,4% y 3,81%, respectivamente, valores inferiores a los obtenidos con el inóculo alto en esta misma cepa de ratón (Fig. 14B). Los

valores absolutos de células/timo con inóculo alto resultaron casi diez veces superiores a los obtenidos para el inóculo bajo (Fig. 15C y Fig. 16D, respectivamente). En este sentido es necesario recordar que el número de células CD4 SP/timo con el inóculo alto fue tres veces mayor que con el bajo (Fig. 12B).

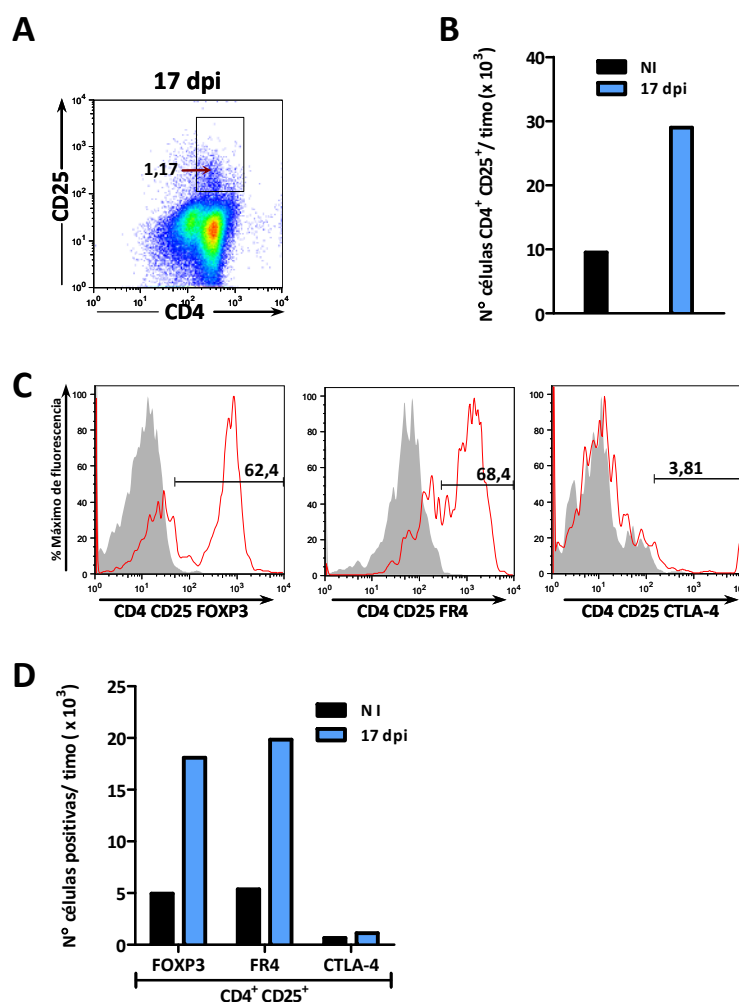


Figura 16. Subpoblaciones de células T reg en el timo de ratones C57BL/6 inoculados con 50 parásitos, analizados mediante citometría de flujo.

A) Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> positivas a los 17 d.p.i. B) Determinación del número de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>/timo. C) Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> positivas para los marcadores de células T reg: FOXP3, FR4, CTLA-4. D) Número total de T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> positivas para los marcadores de células T reg: FOXP3, FR4, CTLA-4 presentes en el timo.

### 3. INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA EN CORAZÓN DURANTE LA FASE AGUDA.

#### 3.1. Mayor infiltración celular inflamatoria cardíaca en ratones menos susceptibles C57BL/6

La infiltración leucocitaria es determinante en la patología de la miocarditis asociada a la infección por *T. cruzi*. Por ello nuestro siguiente objetivo fue determinar el reclutamiento de

células inflamatorias en el tejido cardíaco como respuesta a la infección parasitaria. Para ello evaluamos la infiltración de las poblaciones linfoides y mieloides -CD4 y CD8 (linfocitos T), B220 (linfocitos B), CD68 (macrófagos) y CD11c (células dendríticas)- en el tejido cardíaco mediante qRT-PCR como indicador indirecto del reclutamiento de dichas células en una ventana temporal restringida a los 7, 12, 17 y 22 días post infección. En general, observamos diferencias significativas en ambas cepas de ratón, con ambos inóculos a lo largo de la fase aguda, excepto en los ratones BALB/c para células dendríticas CD11c cuyo producto génico no fue detectado de forma significativa en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 17). Al comparar los resultados entre las dos cepas de ratón, se observó mayor reclutamiento de linfocitos T y B, células dendríticas y macrófagos en ratones C57BL/6 que en BALB/c, independientemente del inóculo empleado (Fig. 17).

Igualmente, analizamos estadísticamente el efecto del inóculo de parásitos sobre ratones de la misma cepa. Para ello, comparamos la media de los ratones infectados con el inóculo bajo respecto a los infectados con el alto, durante los días 7, 12, 17 y 22 d.p.i., excepto en los BALB/c a los 22 d.p.i. inóculo alto (100% mortalidad) (Fig. 17). En los ratones BALB/c observamos diferencias significativas entre los inóculos, al comienzo de la fase aguda para CD4 (7 d.p.i.), CD8 (12 d.p.i.), B220 (7 y 12 d.p.i.) y CD68 (12 d.p.i.). En los ratones de la cepa menos susceptible C57BL/6, detectamos diferencias estadísticamente significativas a lo largo de la fase aguda en CD4 (7 d.p.i.), B220 (12 y 17 d.p.i.), CD68 (12 d.p.i.) y CD11c (12 y 22 d.p.i.).

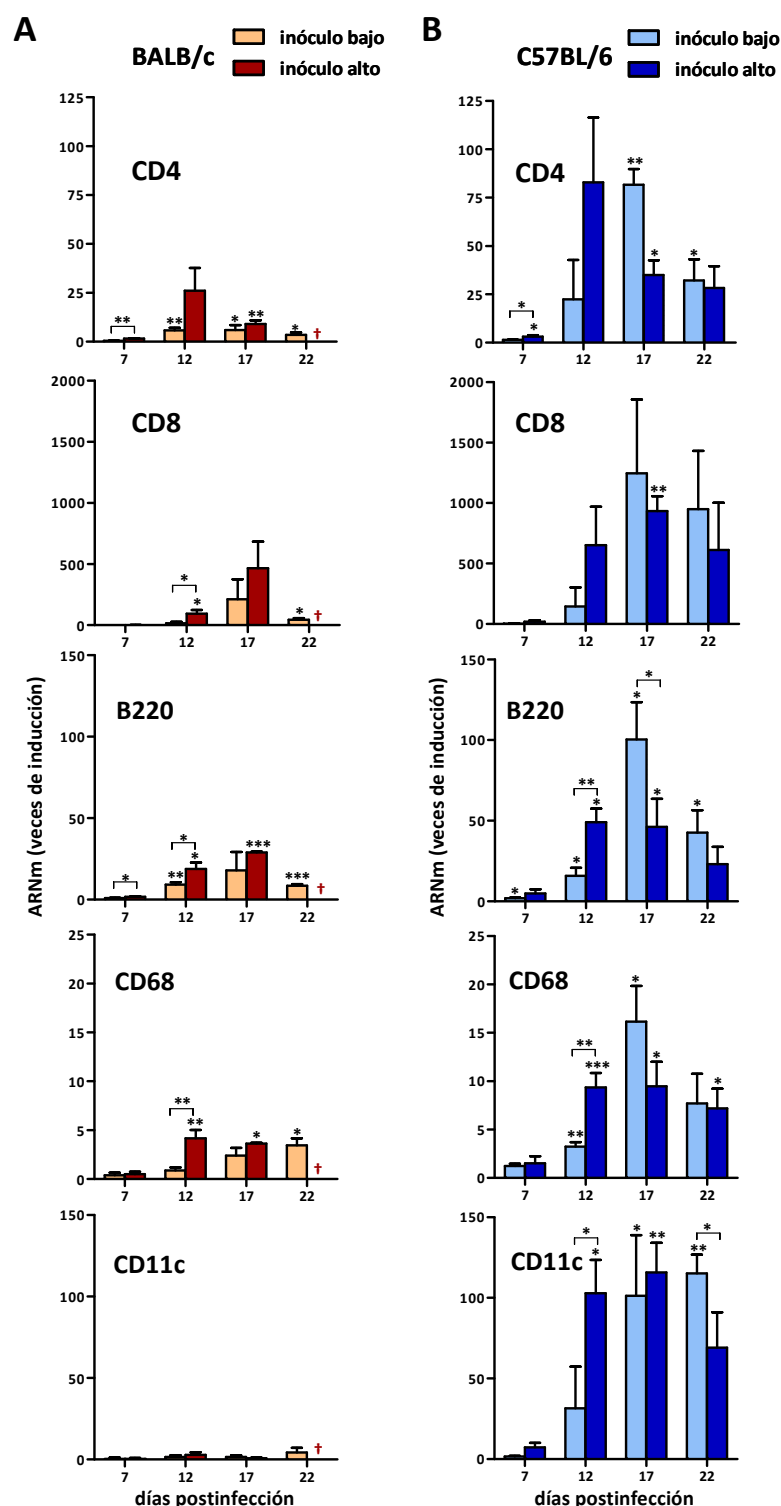


Figura 17. Infiltrado celular inflamatorio cardíaco en ratones infectados con *T. cruzi*. Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de ARNm de los genes relacionados con el infiltrado celular inflamatorio cardíaco (CD4, CD8, B220, CD68 y CD11c) de los ratones, en respuesta a la infección por *T. cruzi*. A) Ratones BALB/c infectados con: inóculo bajo e inóculo alto. B) Ratones C57BL/6 infectados con: inóculo bajo e inóculo alto. Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$  DS). El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística comparando ratones infectados con no infectados, t-Student ( $p < 0,05$ ). La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ). Las gráficas son de un experimento representativo de dos experimentos idénticos e independientes. †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

### 3.2. Mayor inducción de la expresión de citoquinas Th1 en corazón de ratones C57BL/6.

Las citoquinas inflamatorias juegan un papel central en la infección por *T. cruzi*. Las respuestas innata y adaptativa, desencadenadas por el parásito y por moléculas derivadas de su superficie durante la fase aguda, conducen a una producción exacerbada de citoquinas inflamatorias (Bilate & Cunha-Neto, 2008). Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el balance entre las respuesta Th1 y Th2 en el corazón de ratones infectados por *T. cruzi*, es más alto en la cepa resistente C57BL/6 que en la cepa susceptible BALB/c (Cuervo et al., 2008).

En efecto, los resultados de nuestra evaluación muestran que la expresión de citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) en el tejido cardíaco, fue mayor en los ratones C57BL/6 que en los BALB/c probablemente como consecuencia de una mayor inflamación en el corazón de los primeros (Fig. 18). En concordancia con lo descrito anteriormente (apartado 2.2), la inducción de estos genes en ratones C57BL/6 se produjo de forma más tardía al disminuir el número de parásitos del inóculo. Así mismo, puede observarse que con el inóculo alto los ratones BALB/c presentan la expresión máxima para citoquinas a 17 d.p.i., mientras que los C57BL/6 la presentan a 12 d.p.i, además conviene recordar que los ratones BALB/c no sobreviven, mientras que los C57BL/6 presentan niveles casi basales a los 17 d.p.i. En general, observamos mayores diferencias significativas en ratones C57BL/6 con ambos inóculos, en todas las citoquinas evaluadas. Así mismo, el efecto del inóculo sobre una misma cepa de ratón mostró mayor significación estadística en esta cepa de ratón menos susceptibles a la infección por *T. cruzi* (Fig. 18B).

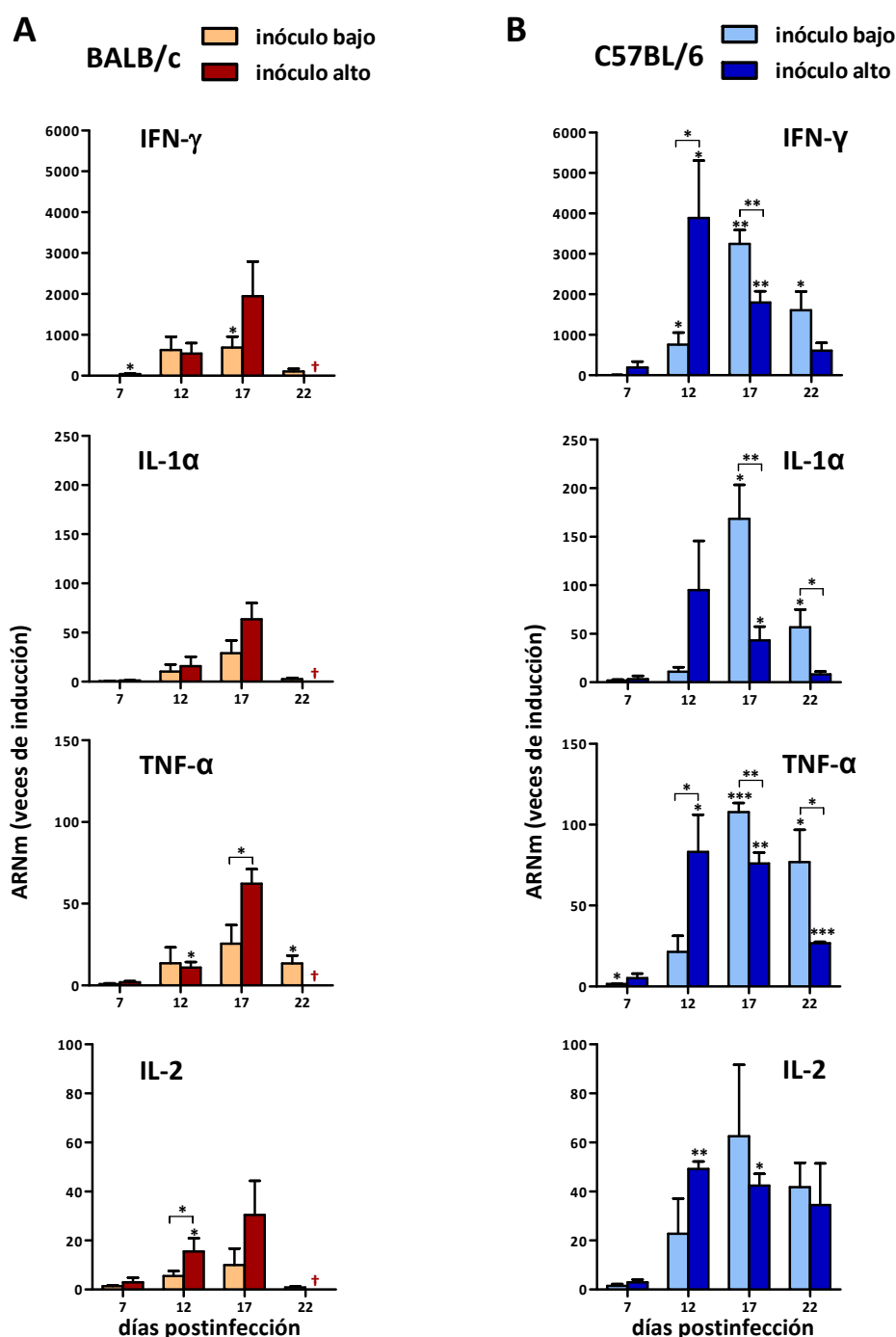


Figura 18. Expresión génica de citoquinas Th1 en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados con *T. cruzi* con los inóculos bajo y alto.

Análisis por RT-PCR a tiempo real de la expresión de ARNm de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 en respuesta a la infección con distintos inóculos. Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$  DS). El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística, t-Student ( $p < 0,05$ ), comparando ratones infectados con no infectados. La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ). Las gráficas son de un experimento representativo de dos experimentos idénticos e independientes. †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

La figura 19 muestra la expresión de la citoquina de fase aguda IL-6 en corazón. Observamos un comportamiento muy similar a lo descrito anteriormente para las citoquinas Th1 en ambas cepas de ratón (Fig. 19).

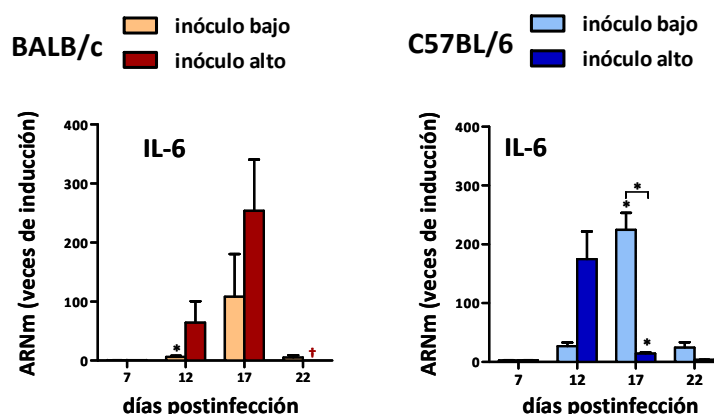


Figura 19. Expresión de IL-6 en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados con inóculos bajo y alto de *T. cruzi*, 50 y 2.000 parásitos, respectivamente.

Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$  DS). El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística comparando ratones infectados con no infectados, t-Student ( $p < 0,05$ ). La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ). Las gráficas son de un experimento representativo de dos experimentos idénticos e independientes. †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

#### 4. RESPUESTA INMUNE REGULADORA EN CORAZON DURANTE LA INFECCION AGUDA POR *T. cruzi*.

Durante una infección parasitaria, la inmunoregulación puede surgir como un efecto atenuador de la respuesta inmune del hospedador al proceso parasitario, y/o puede ser inducida activamente por el parásito, como una estrategia de supervivencia. Belkaid (2007) ha propuesto que el mecanismo de supresión y la naturaleza de las células T reg involucradas en el proceso infeccioso, dependen de la intensidad y del estadio del ciclo patológico. Por ello nos propusimos el estudio de la respuesta inmune reguladora durante la fase aguda de la infección, focalizando nuestro interés en el infiltrado inflamatorio cardiaco, como órgano diana de la patología. Nuestro siguiente objetivo consistió en establecer una posible relación entre la respuesta inmune reguladora y la respuesta observada, en términos de parasitemia, supervivencia y carga parasitaria cardiaca, en cada cepa de ratón frente a los distintos inóculos de *T. cruzi*.



#### **4.1. Mayor expresión de células T reguladoras en tejido cardíaco de ratones C57BL/6.**

Para ello llevamos a cabo estudios de expresión de marcadores de células T reg en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, no infectados e infectados con 50 y 2.000 parásitos/ratón, empleando qRT-PCR. Tres ratones de cada cepa e inóculo, fueron sacrificados en los distintos días de evaluación y cada corazón fue procesado independientemente para aislar el ARN total, como se describió en materiales y métodos.

En general, se observa una tendencia al aumento de la expresión del ARNm en todos los genes evaluados (FOXP3, FR4, CTL-4 y GITR) en ambas cepas con los dos inóculos, a lo largo de la fase aguda (Fig. 20) indicativo del incremento de T reg. Sin embargo, los ratones C57BL/6, mostraron valores más altos que los BALB/c para FOXP3, FR4 y GITR tras la infección (Fig. 20). El análisis estadístico entre muestras de ratones infectados y no infectados mostró diferencias significativas para FR4, CTLA-4 y GITR, pero no para FOXP3 en ambas cepas de ratón (Fig. 20A). Igualmente, se detectaron diferencias significativas entre los dos inóculos para GITR a los 12 d.p.i., pero no para FR4, CTLA-4 y FOXP3 (12 d.p.i.) en ratones BALB/c.

En cambio, los ratones C57BL/6, mostraron un aumento progresivo en FR4, CTLA-4 y GITR con el inóculo bajo, alcanzando un valor máximo a los 17 d.p.i. para luego disminuir a los 22 d.p.i. (Fig. 20B). Cabe destacar que con el inóculo alto, el valor máximo para estos genes, se observó el día 12 p.i., disminuyendo abruptamente a los 17 d.p.i., con muy poca variación a los 22 d.p.i. La variabilidad en FOXP3 entre los ratones C57BL/6 infectados con 50 parásitos, se vio reflejada en los altos valores de desviación estándar (Fig. 20B). No obstante, con el inóculo alto, para FOXP3 se observó una tendencia similar a lo descrito anteriormente para los demás marcadores de células T reg. El análisis estadístico de las medias de inducción de los ratones C57BL/6 infectados con el inóculo bajo respecto al alto, reveló diferencias significativas el día 17 p.i., siendo muy significativas para FR4 (Fig. 20B).

Por último, se observaron diferencias significativas en corazón de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con el inóculo bajo, pero no con el alto, en los días 17 y 22 p.i. con infiltración de células T reg FR4 y GITR ( $p < 0,05$ ) (no representado en el gráfico). Estos

resultados nos indican un posible reclutamiento de células T reg en corazón de ratones C57BL/6 infectados con el inóculo bajo. Es importante mencionar que el patrón de infiltración para los marcadores linfoides y mieloides (Fig. 17, 18 y 19) y de células T reg (Fig. 20) fue muy parecido en las distintas condiciones. Así, con el inóculo bajo la máxima infiltración se observó a 17 d.p.i. en ambas cepas de ratón, mientras que los ratones BALB/c con el inóculo alto presentaron la máxima expresión a 17 d.p.i. produciéndose a continuación la muerte. Por el contrario los ratones C57BL/6 inoculados con el inóculo alto presentaron máxima expresión a 12 d.p.i. disminuyendo rápidamente en días posteriores.

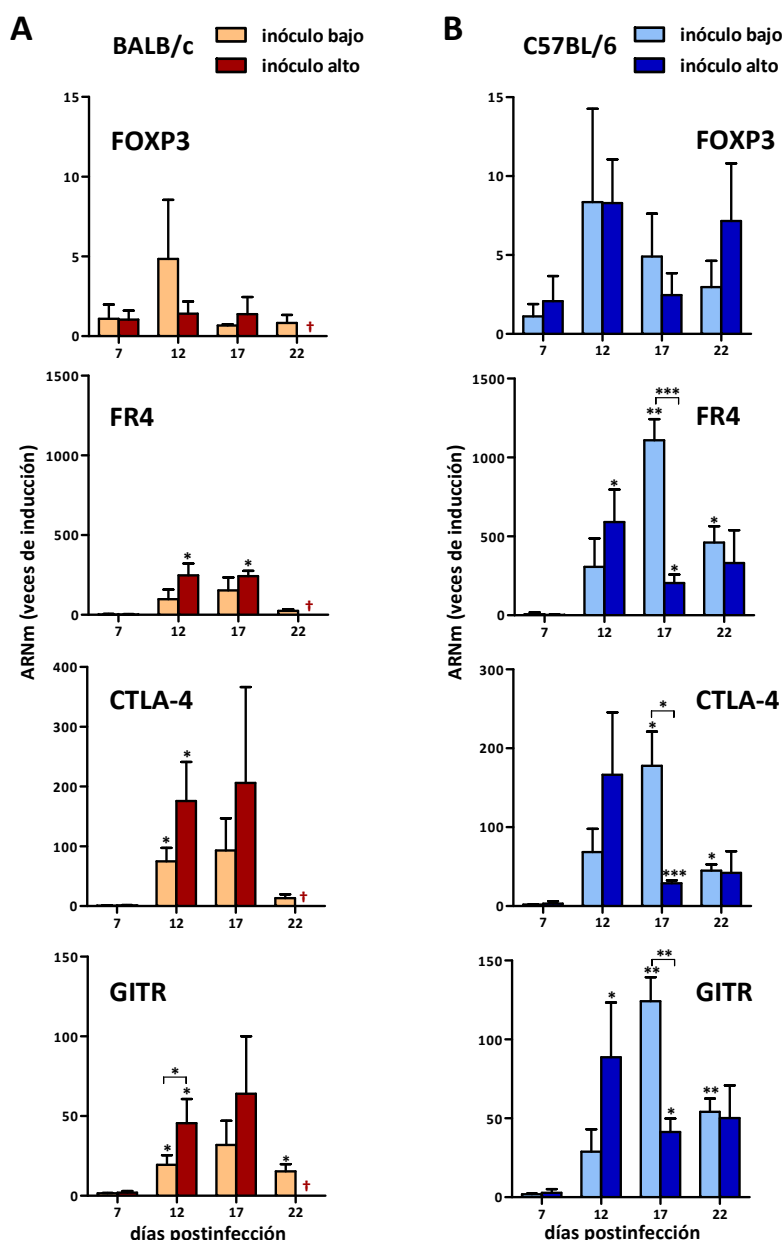


Figura 20. Expresión de marcadores de células T reguladoras en el corazón de los ratones durante la infección aguda.

El ARN total fue aislado a diferentes d.p.i. del corazón de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con 50 y 2.000 par/ratón. Se llevó a cabo la evaluación mediante RT-PCR a tiempo real de la expresión de FOXP3, FR4, CTLA-4 y GITR. La corrección y normalización de los valores se realizó como se describió anteriormente. Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$ DS). El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística, t-Student ( $p < 0,05$ ), comparando ratones infectados con no infectados. La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ). Las gráficas corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes. †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

#### 4.2. Detección de células T reguladoras en el infiltrado inflamatorio cardiaco.

Los resultados del apartado anterior nos indicaban de modo indirecto la posible presencia de células T reg en ratones menos susceptibles C57BL/6 infectados con inóculo

bajo. Por lo tanto, la presencia de células T reg podría asociarse a una disminución en la magnitud de la infección en la fase aguda. Sin embargo, no teníamos evidencia directa de la existencia de dichas poblaciones. Por ello, nos propusimos purificar las células T CD4<sup>+</sup> del infiltrado inflamatorio cardiaco el día 17 p.i. y analizar la expresión de marcadores de células T reg mediante citometría de flujo. El aislamiento y purificación de las células T CD4<sup>+</sup> se llevó a cabo por selección magnética empleando “microbeads” y columnas MACS a partir de tejido cardiaco disgregado mecánicamente y sometido a digestión enzimática. Tras la digestión,  $120 \times 10^6$  células totales fueron obtenidas y el resultado de la purificación en columna fue  $26 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup>. Tras su purificación, las células fueron fijadas con PFA para su posterior análisis. Aparentemente, la fijación de las células, previa al ensayo de citometría de flujo, impidió el subsiguiente marcaje del receptor CD4. En consecuencia, marcamos la población purificada con anticuerpo anti-CD3 para verificar que se trataba de linfocitos T. Efectivamente, el análisis mostró 97,5% de células CD3<sup>+</sup> (Fig. 21A). Además, el 70,3% fue CD25<sup>+</sup>. Así mismo, los porcentajes de células positivas para marcadores de células T reg fueron: 13% (FOXP3<sup>+</sup>), 12,3% (FR4<sup>+</sup>) y 2,61% CTLA-4<sup>+</sup> (Fig. 21, A y B), indicando que la mayor parte de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son células activadas y solo un pequeño porcentaje corresponde a células T reg. En relación al número total de células T CD4<sup>+</sup> obtenido (26 millones) y el número de corazones procesados (n = 25), realizamos el cálculo del número absoluto de células positivas para cada población presente en el corazón de los ratones C57BL/6 evaluados. Los gráficos se muestran en las figuras 21C y 21D. Estos resultados sugieren un papel regulador en miocardio de los linfocitos T reg durante la infección aguda.

De igual manera, fueron analizados los corazones de ratones BALB/c (12 d.p.i.) inoculados con 50 tripomastigotes/ratón y C57BL/6 (12 y 17 d.p.i.) con 2.000 tripomastigotes/ratón. Tras purificar las células T CD4<sup>+</sup>, en ninguno de estos experimentos se detectaron poblaciones de células T reg mediante citometría de flujo (no mostrado).

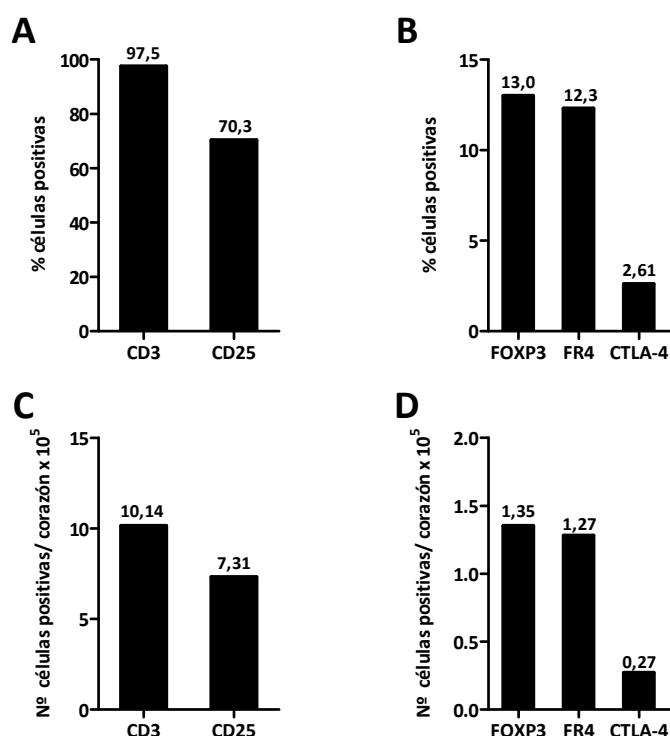


Figura 21. Caracterización fenotípica de poblaciones de células T en corazón de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* durante la fase aguda.

Células T CD4<sup>+</sup> fueron purificadas de 25 corazones de ratones C57BL/6 inoculados con 50 par/ratón el día 17 p.i., como se describió en materiales y métodos. Un total de  $26 \times 10^6$  de linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron teñidas para: A) Receptores de células T: CD3, CD25, B) Marcadores de células T reg: FOXP3, FR4 y CTLA-4. C) y D) Número absoluto de células positivas para cada marcador por corazón. Los porcentajes y número de células positivas se muestran sobre cada barra. Los resultados corresponden a un experimento.

#### 4.3. Detección de otras poblaciones celulares en el infiltrado inflamatorio cardíaco.

Durante el proceso de purificación de las células T CD4<sup>+</sup> presentes en el corazón, la fracción de células negativas para CD4 fue colectada y procesada como se indica en materiales y métodos para su análisis mediante citometría de flujo. El resultado del análisis fenotípico del infiltrado celular inflamatorio cardíaco, obtenido de ratones C57BL/6 infectados con inóculo bajo sacrificados a los días 17 p.i., se muestra en la figura 22. Se detectó la presencia de células CD8<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> en valores de 12,38% y 9,37%, respectivamente (Fig. 22A). Estos porcentajes corresponden a  $6,24 \times 10^5$  células CD8<sup>+</sup> y  $4,72 \times 10^5$  células CD11b<sup>+</sup> por corazón. Durante el análisis se observó una población negativa para todos los marcadores evaluados, que corresponden a cardiomiocitos, fibroblastos u otros tipos celulares presentes en la suspensión de células procedente de los corazones

disgregados mediante métodos mecánicos y enzimáticos (materiales y métodos), que por tratarse de una selección negativa, fueron arrastrados durante el lavado de la columna de purificación de los leucocitos CD4<sup>+</sup>.

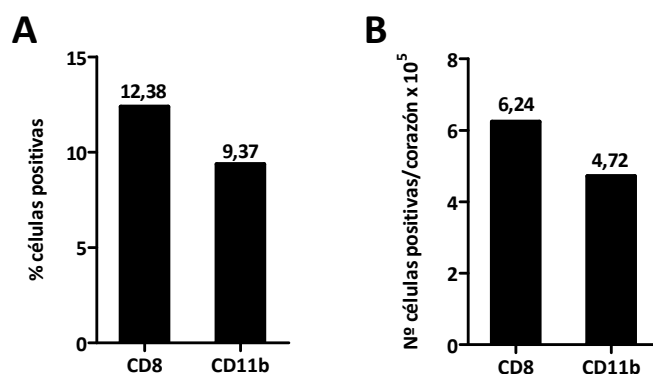


Figura 22. Infiltrado celular inflamatorio de corazones de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*. Células CD4<sup>+</sup> fueron purificadas de 25 corazones de ratones C57BL/6 inoculados con 50 par/ratón el día 17 p.i. y analizadas mediante citometría de flujo. A) Subpoblaciones de células CD8 y CD11b positivas. B) Número absoluto de células positivas para cada marcador por corazón. El porcentaje y número de células positivas se muestra sobre cada barra. Los resultados corresponden a un experimento.

#### 4.4. Supresión de la proliferación de esplenocitos por células T CD4<sup>+</sup> de corazón de ratones C57BL/6.

Para determinar la posible capacidad supresora de las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup>, purificadas de corazón de ratones C57BL/6 infectados (inóculo bajo, día 17 p.i.), llevamos a cabo ensayos de proliferación celular. La figura 23 muestra los resultados del ensayo expresados como la media  $\pm$  (EMS) del índice de proliferación. Este valor representa la relación entre las cuentas por minuto (c.p.m.) de las células incubadas en medio RPMI-5% SFB y las células incubadas en RPMI-5% SFB activadas con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, para cada caso: 1.- esplenocitos de ratones no infectados, 2.- células T CD4<sup>+</sup> de ratones infectados y 3.- esplenocitos de ratones no infectados co-incubados con células TCD4<sup>+</sup> de ratones infectados. En la figura 23 observamos una disminución en la proliferación de las células de bazo no infectado (63,28%) cuando se cultivan simultáneamente con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados del corazón de ratones infectados con *T. cruzi* en la fase aguda. Encontramos diferencias estadísticamente significativas comparando estas poblaciones celulares entre sí (Fig. 23).

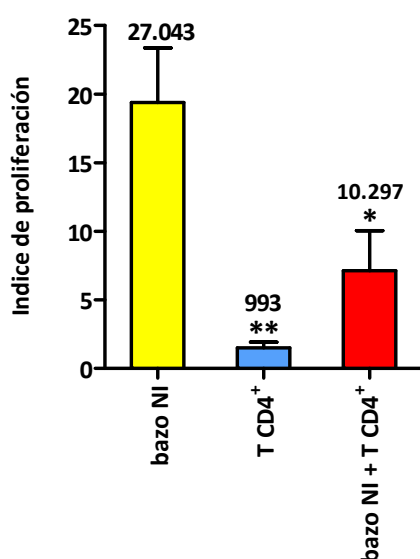


Figura 23. Actividad supresora de células T CD4<sup>+</sup> purificadas del corazón de ratones infectados. Esplenocitos totales provenientes del bazo de ratones C57BL/6 no infectados (NI) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> procedentes del corazón de ratones C57BL/6 infectados con 50 tripomastigotes en el día 17 p.i., fueron purificadas. Las células T CD4<sup>+</sup> cardíacas fueron incubadas en ausencia y presencia de esplenocitos de ratones NI. Los datos están representados como índice de proliferación: cuentas por minuto (c.p.m) de las células incubadas en medio RPMI-5% SFB/ c.p.m de células cultivadas en medio RPMI-5% SFB + anti -CD3 y anti-CD28. Sobre las barras se indica el promedio de c.p.m. para cada grupo. Se graficaron los datos como la media ± (EMS) de seis pocillos correspondientes a un experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas, t-Sudent ( $p < 0,05$ ) al comparar con las células de bazo no infectado.

#### 4.5. Balance de las respuestas T reguladora y Th17 en el infiltrado leucocitario de corazón.

El desarrollo de las células T reguladoras FOXP3<sup>+</sup> y las células T cooperadoras Th17 está íntimamente relacionado, pudiendo regularse entre ellas en términos de generación de inmunopatología o de inmunoregulación (McGeachy & Cua, 2007).

Dado que en corazón de ratones menos susceptibles C57BL/6 observamos un reclutamiento de células T reg y existe cierto balance entre la respuesta reguladora y la Th17, nos propusimos estudiar la expresión de citoquinas asociadas a cada tipo celular en ambas cepas de ratón y con inóculos bajo y alto. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones infectados y no infectados (asteriscos sobre la barra de cada grupo) de ambas cepas, para las citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$ , a lo largo de la infección en todos los modelos experimentales (Fig. 24). Además, los resultados mostraron que a día 17 p.i., en corazón de ratones C57BL/6 infectados con el inóculo bajo, se apreció una mayor inducción

de la expresión del ARNm de las citoquinas asociadas a las células T reg, tales como IL-10 y TGF- $\beta$ , que en los ratones los BALB/c infectados con el mismo inóculo. Al comparar los inóculos altos se observa un aumento de la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$  de magnitud similar en ambas cepas de ratón, sin embargo, en ratones C57BL/6 se produce una drástica reducción de la expresión de IL-10 después del día 12 p.i., mientras que en los BALB/c se incrementa a partir del día 12 p.i. produciéndose la muerte de los ratones a 22 d.p.i. Al comparar entre los inóculos para cada cepa de ratón solo detectamos diferencias estadísticamente significativas en los días 12 y 17 p.i. para IL-10 en BALB/c y en los días 7 y 17 p.i. tanto para IL-10 como para TGF- $\beta$  en C57BL/6 (Fig. 24).

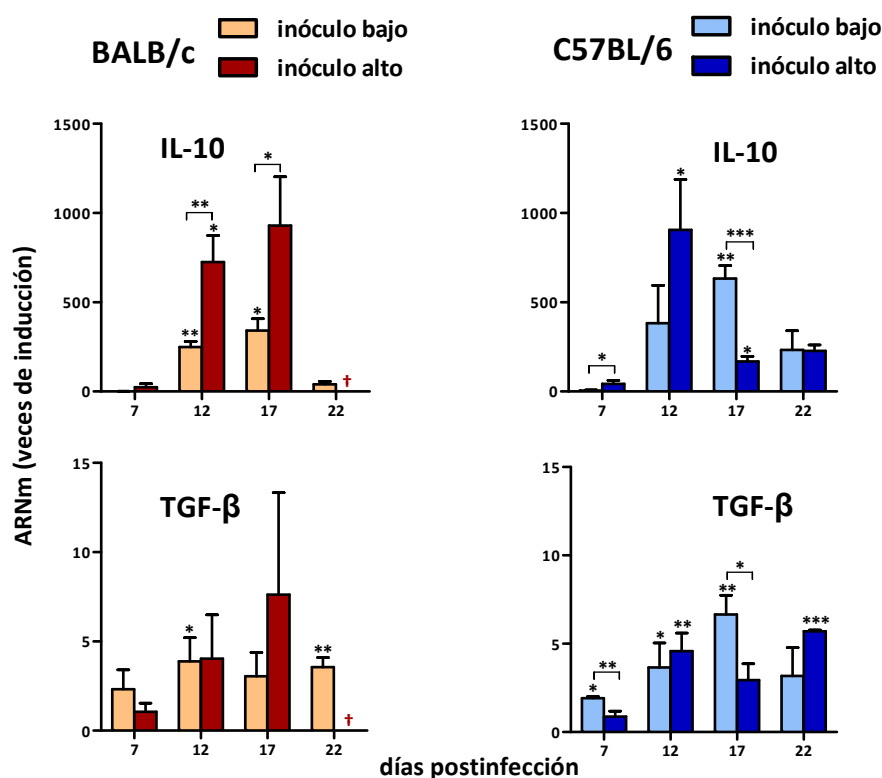


Figura 24. Expresión de citoquinas asociadas a las células T reguladoras naturales en el corazón de ratones infectados.

El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística, t-Student ( $p < 0,05$ ), comparando ratones infectados con no infectados. La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ). Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$ DS). †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

Por otra parte, observamos mayor inducción de la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-17 en los BALB/c a los 17 d.p.i. con ambos inóculos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas frente a los C57BL/6 con ambos inóculos (Fig. 25).



La inducción fue mayor en los BALB/c con el inóculo bajo, detectándose diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos inóculos (Fig. 25). Como se observa en la figura 26, la citoquina IL-23 mostró poca inducción (valor máximo 1,75 veces). Demostró ser más significativa en BALB/c con inóculo alto que en inóculo bajo al comparar con ratones C57BL/6.

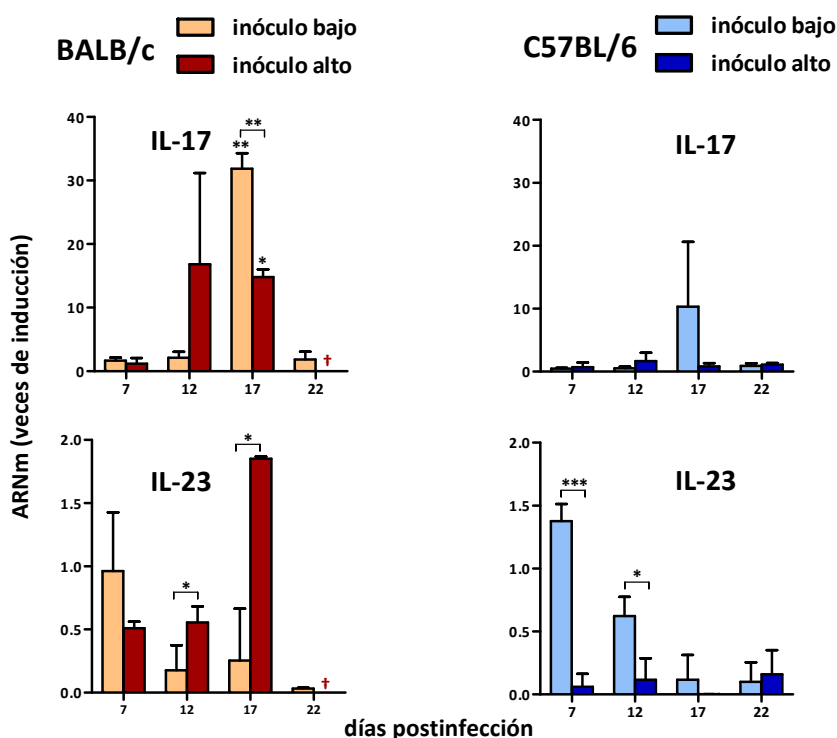


Figura 25. Expresión de citoquinas asociadas a la respuesta Th17 en corazón. Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$  DS). La barra indica el análisis estadístico entre inóculos en una misma cepa de ratones. †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

Los factores de transcripción asociados a la respuesta Th17 evaluados: ROR $\gamma$ t, STAT-3 e IRF4, mostraron una tendencia a una mayor expresión en los BALB/c con el inóculo alto, sin embargo no se encontraron diferencias significativas.

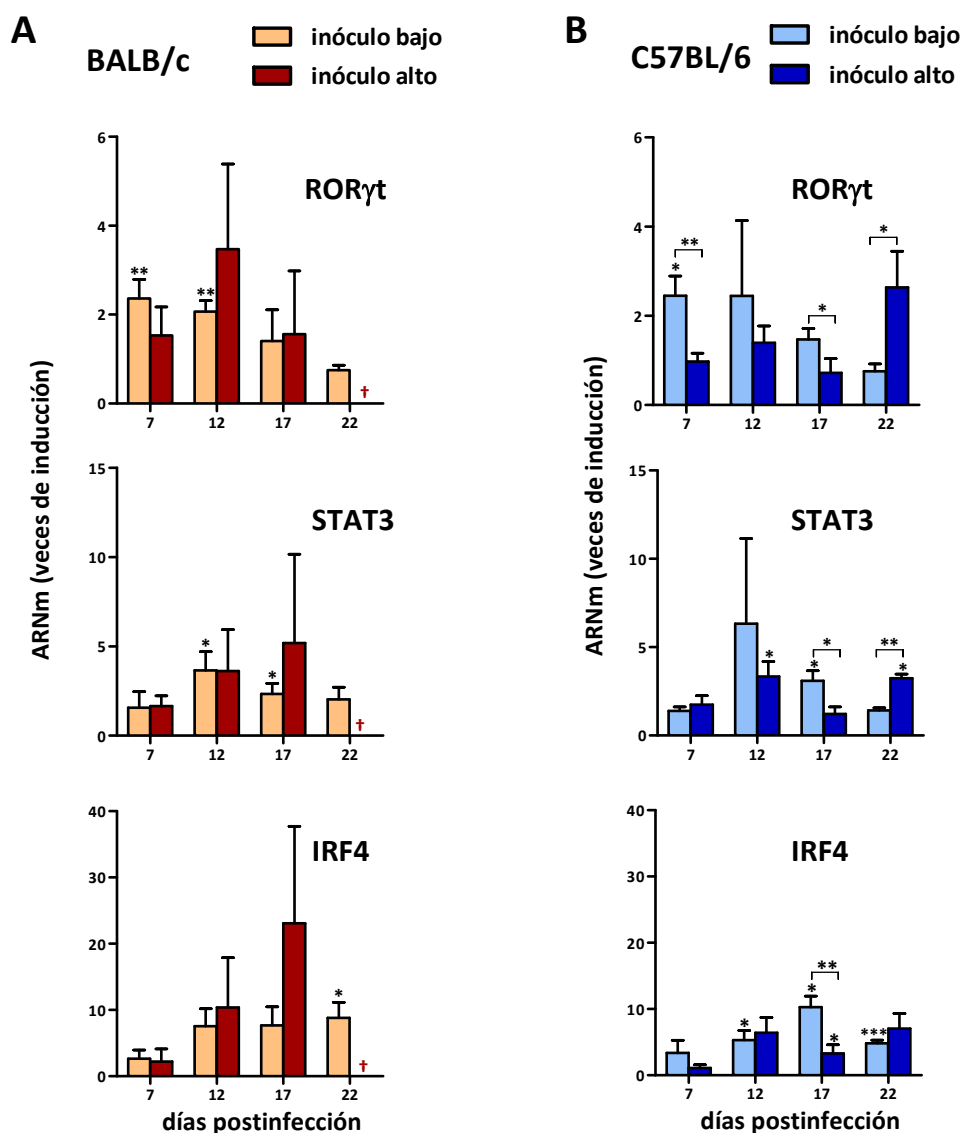


Figura 26. Expresión de factores de transcripción asociados a Th17.

Se representa la media de inducción de tres ratones ( $\pm$  DS). El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística, t-Student ( $p < 0,05$ ), comparando ratones infectados con no infectados. La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ). †: BALB/c 100% de mortalidad a los 22 d.p.i.

## 5. IMPORTANCIA DE LA SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDADOR EN LA EVOLUCION DE LA FASE CRONICA.

El empleo de un inóculo bajo de parásitos (50 tripomastigotes/ratón) permitió llevar a cabo el análisis inmunopatológico en los BALB/c supervivientes durante la fase crónica. Los C57BL/6 infectados con los dos inóculos fueron evaluados en esta misma fase. La presencia de nidos de *T. cruzi* en el tejido cardíaco de ratones de ambas cepas a los 100 d.p.i. (inóculo

bajo) fue demostrada mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (Fig. 27). La figura 27, A y B, BALB/c y C57BL/6, respectivamente, muestra la presencia de nidos de menor tamaño que en la fase aguda (apartado 1.4 de resultados) y en menor cantidad en ambas cepas de ratón en los cortes analizados.

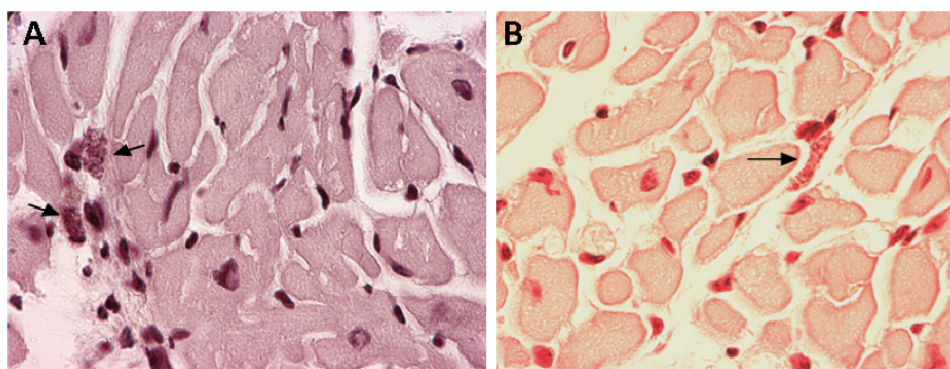


Figura 27. Estudio histológico de cortes de tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *T. cruzi*, en fase crónica (día 100 p.i.).

Las flechas señalan los nidos de amastigotes. Tinción con hematoxilina & eosina. 630x.

Así mismo, la presencia del parásito o de su ADN de *T. cruzi* fue evaluada mediante PCR Multiplex con ADN de tejido cardiaco de los ratones supervivientes (100 d.p.i. BALB/c inóculo bajo; 100 y 451 d.p.i. C57BL/6 inóculo bajo y 100 d.p.i. inóculo alto) mostrando la persistencia del ADN de *T. cruzi* en todos los grupos de ratones evaluados (Fig. 28, A, B y C). Sin embargo, la carga parasitaria fue mayor en los ratones BALB/c que en los C57BL/6.

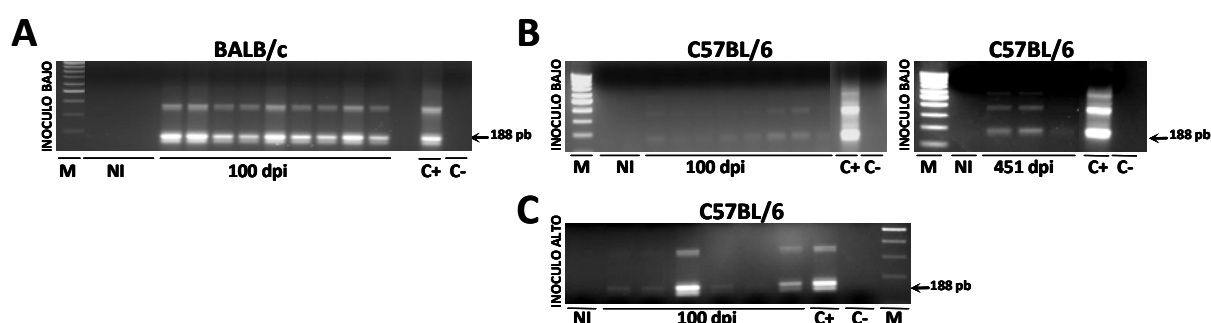


Figura 28. Detección del ADN de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de ratones infectados durante la fase crónica.

A) BALB/c (100 d.p.i., inóculo bajo). B) C57BL/6 (100 y 245 d.p.i., inóculo bajo). C) C57BL/6 (100 d.p.i., inóculo alto). PCR Multiplex basado en la detección de ADN de *T. cruzi*. Se emplearon las sondas TCZ1, TCZ2, TCZ3 y TCZ4. 100 ng de ADN total/reacción fueron amplificados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar el perfil de citoquinas sistémicas en los ratones crónicos, empleando la misma metodología que en la fase aguda. Los resultados en fase crónica con el inóculo bajo se muestran en las tablas 5 y 6, BALB/c y C57BL/6,

respectivamente. Es de destacar que muchas citoquinas presentan niveles alterados respecto a controles de su misma edad. Se observó que la concentración de IFN- $\gamma$  en suero se mantuvo elevada en ambas cepas a día 100 p.i., mostrando un notable incremento el día 245 p.i. con valores superiores a 20.000 pg/ml de suero. El valor de IL-6 fue mayor en C57BL/6 a los 100 d.p.i., mientras que a los 245 d.p.i. resultó más elevado en BALB/c. La citoquina inmunoreguladora IL-10 se mostró en mayor concentración en C57BL/6 a los 100 d.p.i. y luego aumentó en ambas cepas a valores mayores de 20.000 pg/ml de suero (Tablas 5 y 6). Con respecto a las citoquinas relacionadas con las células Th17, observamos valores elevados de IL-17 en C57BL/6 los dos días de evaluación (Tabla 6) y un aumento de la IL-23 en los BALB/c a los 245 d.p.i. (Tabla 5).

**TABLA 5.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones BALB/c  
Inóculo: 50 parásitos/ratón  
Evaluación en fase crónica‡

Citoquina	Concentración media $\pm$ EMS (pg/ml) a diferentes días post infección			
	NI n = 3	100 n = 6	NI n = 3	245 n = 4
IFN- $\gamma$	0	111 $\pm$ 60	0	> 20.000***
TNF- $\alpha$	0	0	61 $\pm$ 34	43 $\pm$ 28
IL-2	51 $\pm$ 33	39 $\pm$ 18	14 $\pm$ 14	0
IL-4	48 $\pm$ 30	0	4 $\pm$ 4	0
IL-5	0	0,7 $\pm$ 0,7	51 $\pm$ 32	535 $\pm$ 241
IL-6	83 $\pm$ 26	161 $\pm$ 43	265 $\pm$ 105	6.889 $\pm$ 3.521
IL-10	0	41 $\pm$ 22	30 $\pm$ 30	> 20.000
GM-CSF	0	0	60 $\pm$ 37	10 $\pm$ 10
IL-17	20 $\pm$ 7	23 $\pm$ 6	83 $\pm$ 53	100 $\pm$ 52
IL-23	ND	ND	0	319 $\pm$ 179

‡ Etapa posterior a la fase aguda, después de 60 d.p.i

NI controles no infectados

n es el número de ratones por grupo experimental

ND no determinado

\*\*\* P < 0,0001, prueba t-Student, comparando al grupo control no infectado para cada tiempo de infección

**TABLA 6.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6

Inóculo: 50 parásitos/ratón

Evaluación en fase crónica‡

Citoquina	Concentración media $\pm$ EMS (pg/ml) a diferentes días post infección			
	NI n = 4	100 n = 5	NI n = 3	245 n = 3
IFN- $\gamma$	<b>36 <math>\pm</math> 22</b>	<b>117 <math>\pm</math> 46</b>	<b>622 <math>\pm</math> 418</b>	<b>&gt; 20.000</b>
TNF- $\alpha$	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>190 <math>\pm</math> 71</b>
IL-2	<b>186 <math>\pm</math> 99</b>	<b>15 <math>\pm</math> 10</b>	<b>43 <math>\pm</math> 33</b>	<b>0</b>
IL-4	<b>9 <math>\pm</math> 7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
IL-5	<b>19 <math>\pm</math> 5</b>	<b>48 <math>\pm</math> 16</b>	<b>0</b>	<b>419 <math>\pm</math> 117</b>
IL-6	<b>34 <math>\pm</math> 10</b>	<b>275 <math>\pm</math> 96</b>	<b>67 <math>\pm</math> 24</b>	<b>1398 <math>\pm</math> 418</b>
IL-10	<b>11 <math>\pm</math> 7</b>	<b>461 <math>\pm</math> 170</b>	<b>536 <math>\pm</math> 173</b>	<b>&gt; 20.000</b>
GM-CSF	<b>66 <math>\pm</math> 30</b>	<b>9 <math>\pm</math> 6</b>	<b>0</b>	<b>16 <math>\pm</math> 16</b>
IL-17	<b>29 <math>\pm</math> 11</b>	<b>96 <math>\pm</math> 37</b>	<b>0</b>	<b>301 <math>\pm</math> 117</b>
IL-23	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>4659 <math>\pm</math> 2974</b>	<b>5964 <math>\pm</math> 1698</b>

‡ Etapa posterior a la fase aguda, después de 60 d.p.i

NI controles no infectados

n es el número de ratones por grupo experimental

ND no determinado

En la tabla 7 se muestran las concentraciones de citoquinas en suero de ratones C57BL/6 infectados con 2.000 parásitos y evaluados a los 100 d.p.i. Se destacan los valores de IL-6 e IL-10 superiores a los no infectados y la inhibición de IL-2.

**TABLA 7.** Niveles de citoquinas Th1/ Th2/ Th17 en suero de ratones C57BL/6  
Inóculo: 2.000 parásitos/ratón  
Evaluación en fase crónica‡

Citoquina	Concentración media $\pm$ EMS (pg/ml) a los ... días post infección	
	NI n = 4	100 n = 6
IFN- $\gamma$	<b>36 <math>\pm</math> 22</b>	<b>57 <math>\pm</math> 22</b>
TNF- $\alpha$	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>IL-2</b>	<b>186 <math>\pm</math> 99</b>	<b>14 <math>\pm</math> 8</b>
IL-4	<b>9 <math>\pm</math> 7</b>	<b>5 <math>\pm</math> 4</b>
IL-5	<b>19 <math>\pm</math> 5</b>	<b>34 <math>\pm</math> 8</b>
<b>IL-6</b>	<b>34 <math>\pm</math> 10</b>	<b>215 <math>\pm</math> 50</b>
<b>IL-10</b>	<b>11 <math>\pm</math> 7</b>	<b>231 <math>\pm</math> 89</b>
GM-CSF	<b>66 <math>\pm</math> 30</b>	<b>7 <math>\pm</math> 4</b>
IL-17	<b>29 <math>\pm</math> 11</b>	<b>57 <math>\pm</math> 19</b>

‡ Etapa posterior a la fase aguda (después de 60 d.p.i)

NI controles no infectados

n es el número de ratones por grupo experimental

Para evaluar posibles alteraciones en las poblaciones celulares del timo a día 100 de infección, realizamos análisis mediante citometría de flujo. No observamos diferencias en los porcentajes de las poblaciones DP y SP entre los ratones controles no infectados y los crónicos de cada grupo experimental (Fig. 29).

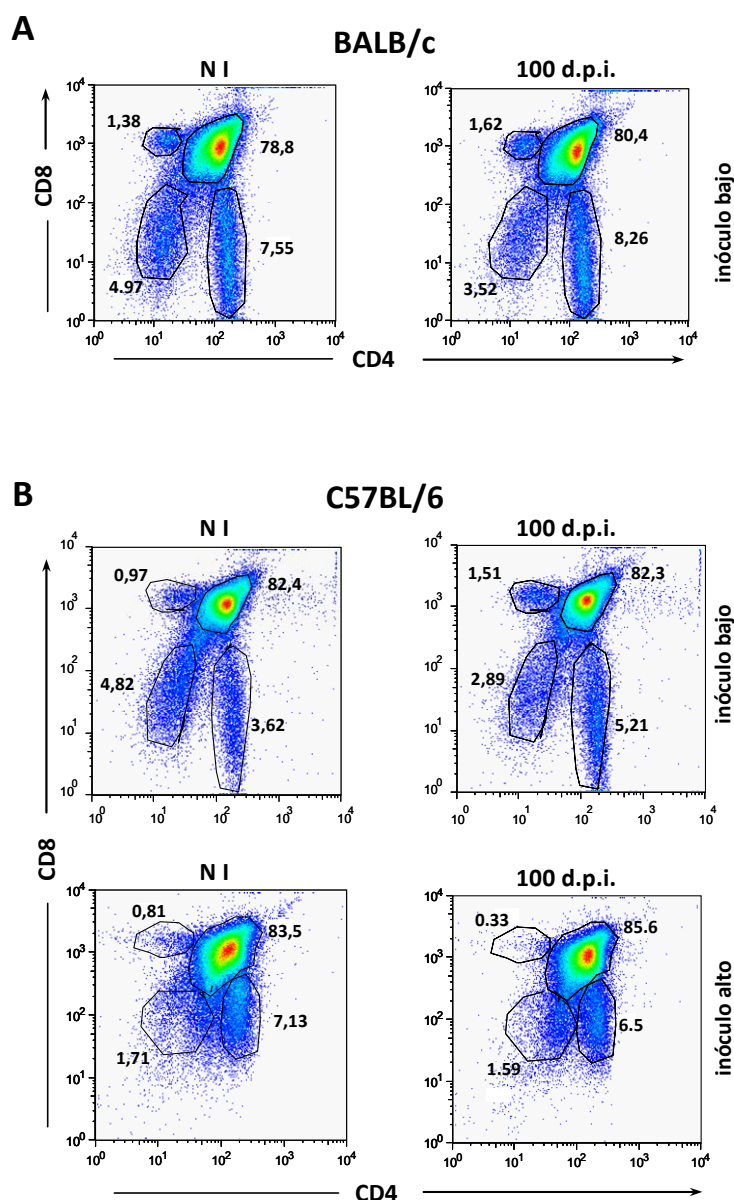


Figura 29. Análisis mediante citometría de flujo de los tipos de linfocitos TCD4 y TCD8 presentes en el timo de ratones infectados en fase crónica.

A) Timo de ratones Balb/c no infectados e infectados con inóculo bajo. B) Timo de ratones C57BL/6 no infectados e infectados con inóculo bajo y alto. Los ejes de los gráficos corresponden a la fluorescencia. Los números indican los porcentajes de células positivas de cada población: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. NI: no infectado

La figura 30 muestra el análisis mediante RT-PCR del infiltrado celular inflamatorio cardíaco de los animales infectados a los 100 d.p.i. En general, los genes evaluados: CD4, CD8, CD11c, CD68 y B220, presentaron valores de inducción detectables pero mucho más bajos que en fase aguda. Destaca la elevada cantidad de células TCD8 en ratones BALB/C. De los tres modelos experimentales, los BALB/c mostraron mayor significación estadística en

comparación con los no infectados en todos los genes analizados, excepto para CD68 (Fig. 30). Así mismo, al comparar las dos cepas de ratón, BALB/c y C57BL/6, inoculados con 50 parásitos se observó que los valores de inducción fueron mayores en los BALB/c, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los genes: CD8, CD11c y B220 ( $P < 0,05$ , t-Student) (Fig. 30).

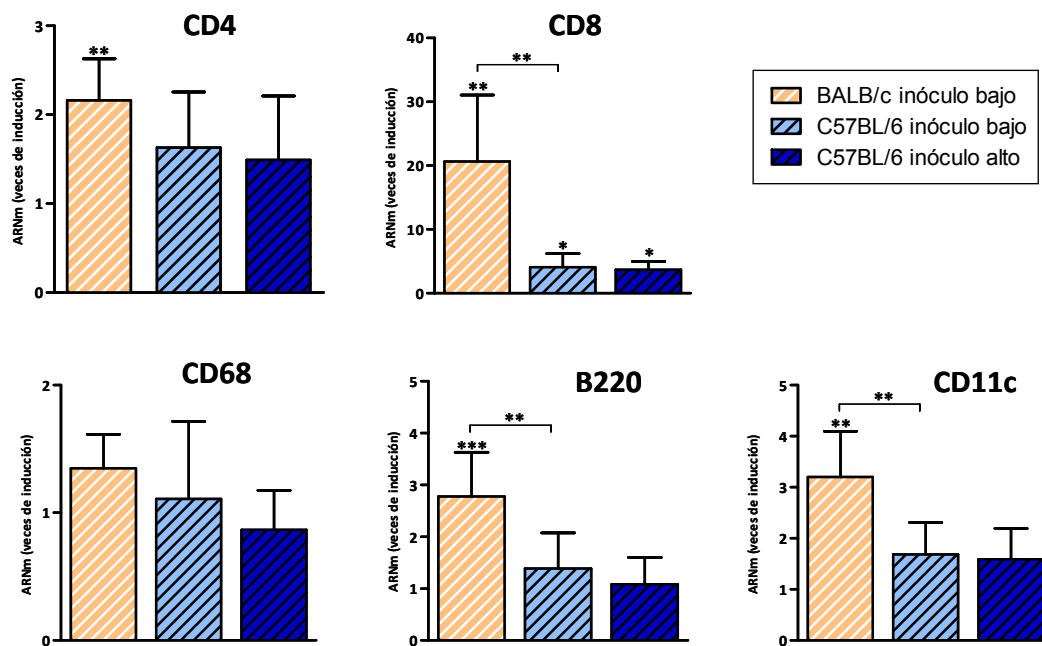


Figura 30. Infiltrado celular inflamatorio cardíaco en ratones infectados en fase crónica (100 d.p.i.). Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de ARNm de los genes relacionados con el infiltrado celular inflamatorio cardíaco (CD4, CD8, B220, CD68 y CD11c) de los ratones, en respuesta a la infección. Se representa la media de inducción de 5 a 8 ratones ( $\pm$  DS).

La expresión génica de citoquinas Th1 en el tejido cardíaco fue evaluada a los 100 d.p.i. La figura 31A muestra que los tres grupos experimentales presentaron diferencias significativas al comparar con los controles no infectados. La presencia del IFN- $\gamma$  resultó mayor en C57BL/6 infectados con inóculo alto, encontrando diferencias significativas al compararlo con el inóculo bajo. Así mismo, entre BALB/c y C57BL/6 (inóculo bajo) hallamos diferencias significativas (Fig. 31A). Contrariamente a lo encontrado en la fase aguda, el TNF- $\alpha$  mostró los mayores valores de inducción, con diferencias estadísticamente muy significativas respecto al no infectado y a C57BL/6 (Fig. 31B). La IL1- $\alpha$  presentó diferencias significativas entre las dos cepas (Fig. 31C) y finalmente la IL-2 mostró valores de expresión similares en los tres grupos de ratones y diferencias estadísticas con respecto a los no



infectados solo en los infectados con el inóculo bajo, las cuales fueron mas significativas en los BALB/c (Fig. 31D). Los valores de la citoquina IL-6 no mostraron variación en los tres grupos, ni diferencias significativas respecto a los controles no infectados (no mostrado).

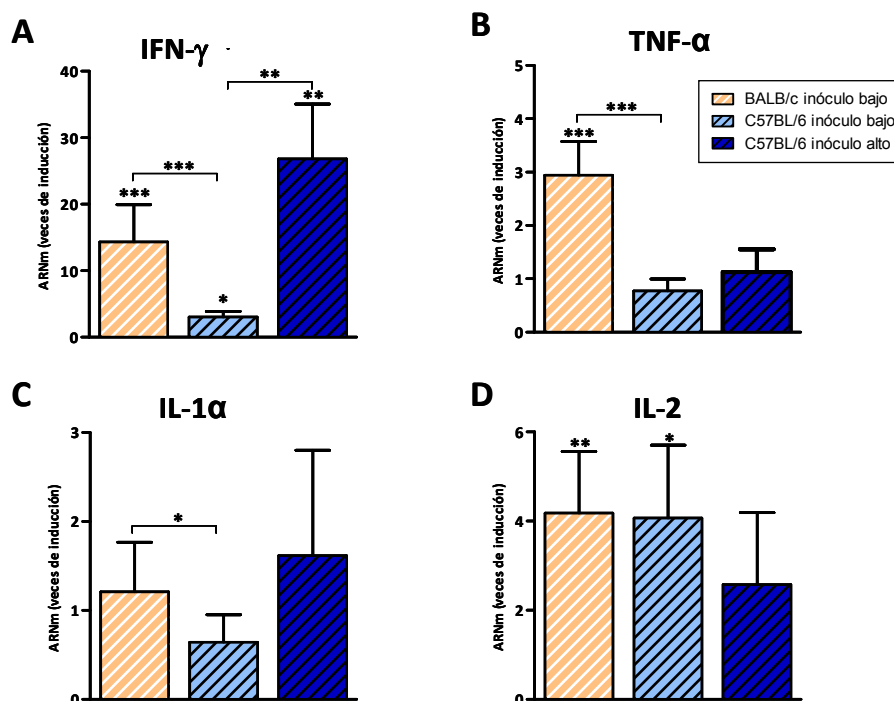


Figura 31. Expresión de citoquinas Th1 en el corazón de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados en fase crónica a los 100 d.p.i.

A) IFN- $\gamma$ . B) TNF- $\alpha$ . C) IL-1 $\alpha$ . D) IL-2. Se representa la media de inducción de 5 a 8 ratones ( $\pm$  DS). El (los) asterisco(s) sobre la DS indican la significancia estadística, t-Student ( $p < 0,05$ ), comparando ratones infectados con no infectados. La barra y el (los) asterisco(s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ).

La figura 32 representa la expresión génica de las citoquinas inmunoregulatoras, IL-10 y TGF- $\beta$ , y del gen GITR, expresado en T reg en el tejido cardíaco de ratones con 100 días de infección por *T. cruzi*. Se destaca la elevada inducción de IL-10 en BALB/c con respecto a C57BL/6, mostrando diferencias significativas al comparar con los controles no infectados y con la cepa menos susceptible (Fig. 31A). Idénticos resultados fueron obtenidos para el TGF- $\beta$  tras su análisis estadístico (Fig. 30B). El marcador de células T reguladoras, GITR, igualmente mostró mayor inducción en los BALB/c (Fig. 31C).

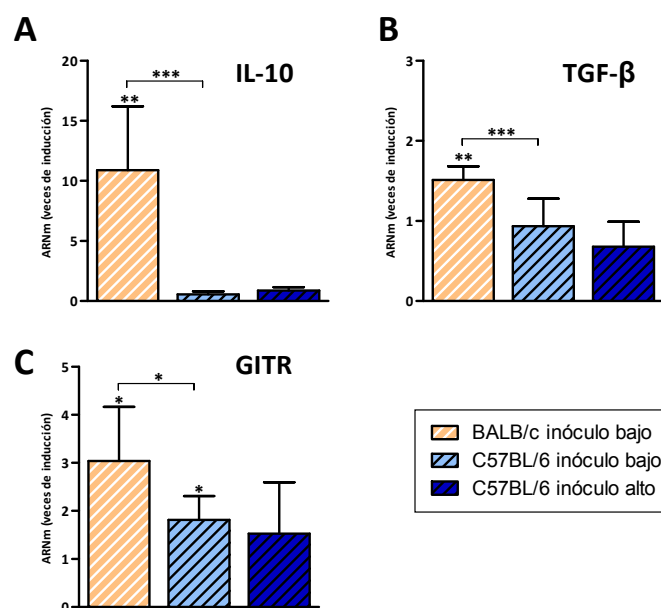


Figura 32. Expresión de marcadores de células T reguladoras y citoquinas anti-inflamatorias en el corazón de los ratones durante la infección crónica (100 d.p.i.).

A) IL-10. B) TGF-β. C) GITR. Se representa la media de inducción de 5 a 8 ratones ( $\pm$  DS). El (los) asterisco (s) sobre la DS indican la significancia estadística, t-Student ( $p < 0,05$ ), comparando ratones infectados con no infectados. La barra y el (los) asterisco (s) sobre ella indican el análisis estadístico entre inóculos, t-Student ( $p < 0,05$ ).

Los genes relacionados con las células T reg: FOXP3, FR4 y CTLA-4, no mostraron diferencias significativas respecto a los controles en los tres grupos experimentales (Tabla 8).

**TABLA 8.** Expresión del ARNm de genes relacionados con la respuesta T reguladora en corazón de ratones infectados con *T. cruzi* en fase crónica (100 d.p.i.)

GEN	Veces de inducción del ARNm (media $\pm$ DS)		
	BALB/c	C57BL/6	
	inóculo bajo n = 8	inóculo bajo n = 8	inóculo alto n = 5
FOXP3	<b>1,04 <math>\pm</math> 0,36</b>	<b>0,65 <math>\pm</math> 0,43</b>	<b>0,50 <math>\pm</math> 0,32</b>
FR4	<b>1,88 <math>\pm</math> 1,36</b>	<b>1,16 <math>\pm</math> 0,66</b>	<b>1,20 <math>\pm</math> 1,63</b>
CTLA-4	<b>1,03 <math>\pm</math> 0,36</b>	<b>1,13 <math>\pm</math> 0,89</b>	<b>0,58 <math>\pm</math> 0,28</b>

Se representan los resultados de un único experimento de cada tipo.

Se emplearon tres ratones no infectados en cada experimento.

Los valores de la media de inducción de los ratones infectados están normalizados a la media de los controles no infectados

n es el número de ratones infectados por experimento.

Finalmente evaluamos la expresión génica de las citoquinas, IL-17 e IL-23 y de genes relacionados con la respuesta Th17, ROR $\gamma$ t, IRF4 y STAT3. Los resultados se muestran en la tabla 9. En general, no apreciamos diferencias significativas en estos genes con respecto a los controles no infectados de cada grupo, excepto para el gen STAT3 ( $P < 0,0001$ , t-Student).

**TABLA 9.** Expresión del ARNm de genes relacionados con la respuesta Th17 en corazón de ratones infectados con *T. cruzi* en fase crónica (100 d.p.i.)

GEN	Veces de inducción del ARNm (media $\pm$ DS)		
	BALB/c	C57BL/6	
	inóculo bajo n = 8	inóculo bajo n = 8	inóculo alto n = 5
IL-17	<b>1,30</b> $\pm$ 1,55	2,06 $\pm$ 1,95	0,78 $\pm$ 0,76
IL-23	<b>0,81</b> $\pm$ 0,22	0,74 $\pm$ 0,47	0,56 $\pm$ 0,33
ROR- $\gamma$ t	<b>0,88</b> $\pm$ 0,18	1,33 $\pm$ 0,87	1,33 $\pm$ 0,72
IRF4	<b>1,00</b> $\pm$ 0,49	0,72 $\pm$ 0,37	0,39 $\pm$ 0,27
STAT3	<b>1,58</b> $\pm$ 0,17	1,25 $\pm$ 0,82	0,79 $\pm$ 0,38

Se representan los resultados de un único experimento de cada tipo.

Se emplearon tres ratones no infectados en cada experimento.

Los valores de la media de inducción de los ratones infectados están normalizados a la media de los controles no infectados

n es el número de ratones infectados por experimento.



## V. DISCUSION.

La patogénesis de la cardiomiopatía chagásica crónica en ser el humano no ha sido dilucidada en su totalidad, siendo uno de los mayores retos la caracterización de la compleja interacción hospedador-parásito. Actualmente, las evidencias apoyan la naturaleza multifactorial de la enfermedad de Chagas cardiaca, incluyendo la persistencia del agente patógeno y los mecanismos immunoreguladores del hospedador (Gutiérrez y col., 2009). Las razones por las cuales la infección con *Trypanosoma cruzi* resulta en diferentes grados de patología aun son desconocidas. Se ha propuesto que la combinación del genotipo del parásito y del hospedador, conduce a los diferentes grados de patología (Bilate & Cunha-Neto, 2008). En este trabajo hemos intentado profundizar en las relaciones entre el genotipo del hospedador y las respuestas inmunológicas, patológicas y reguladoras.

### 1. EFECTO DEL INOCULO DE PARASITOS Y LA SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDADOR EN LA PARASITEMIA Y LA CARGA PARASITARIA EN TEJIDO CARDIACO.

Con algunas excepciones, el modelo experimental murino representa la herramienta mas adecuada para el estudio del sistema inmunológico de mamíferos. A nivel celular, molecular y fenomenológico, es notable la semejanza y paralelismo entre el sistema inmunológico humano y el murino. Más aún, el desarrollo de lesiones crónicas inflamatorias y degenerativas en el músculo cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi*, es muy semejante a las encontradas en el hombre infectado con el parásito (Dos Reis & Lopes, 2000). El empleo de un elevado número de parásitos (inóculo) de *T. cruzi* (Bilate y col., 2003), así como una alta carga parasitaria durante la fase aguda experimental han sido asociadas a una enfermedad cardiaca mas agresiva (Marinho y col., 1999; Zhang & Tarleton, 1999), sugiriendo una estrecha relación entre carga parasitaria y severidad de la infección en modelos animales. Así mismo, Tarleton y col., 1996, han descrito la relación entre la carga parasitaria y la severidad de las lesiones inflamatorias en animales crónicamente infectados por *T. cruzi*.

En nuestra investigación, el estudio parasitológico de la infección empleando diferentes inóculos de una cepa altamente virulenta de *T. cruzi* (cepa Y), nos permitió

seleccionar un inóculo bajo (50 par/ratón) que extendió el período de supervivencia de los ratones mas susceptibles a la infección y de esta manera, pudimos evaluar el desarrollo de la enfermedad durante las fases aguda y crónica en las dos cepas empleadas, BALB/c y C57BL/6, modelo susceptible y menos susceptible, respectivamente. Nuestros resultados mostraron que incrementando cuarenta veces el inóculo bajo hasta 2.000 par/ratón (inóculo alto), no hubo una variación significativa en la evolución de la parasitemia en los ratones susceptibles BALB/c durante la fase aguda. No obstante, detectamos diferencias significativas en la carga parasitaria cardiaca de los BALB/c infectados con los distintos inóculos, observándose un incremento de casi dos órdenes de magnitud entre el inóculo bajo y el inóculo alto (100% de mortalidad). La estabilización de la carga parasitaria cardiaca a los 22 días post infección, así como la disminución en la mortalidad de los ratones BALB/c infectados con el inóculo bajo (70% mortalidad), sugiere un control del parásito, por parte del sistema inmunológico. En el modelo menos susceptible, C57BL/6, la parasitemia mostró un incremento directamente proporcional al inóculo empleado. Sin embargo, nuestros resultados han demostrado la supervivencia de todos los ratones C57BL/6 infectados con ambos inóculos durante la fase aguda y una menor carga parasitaria cardiaca que los BALB/c. Cabe señalar el retraso detectado en el tiempo requerido para alcanzar el máximo valor de carga parasitaria cardiaca al disminuir el inóculo en los C57BL/6 (12 y 17 d.p.i., inóculo alto y bajo respectivamente). Nuestros resultados sugieren que en ratones C57BL/6, el aumento del inóculo conlleva al control inmunológico de la carga parasitaria más temprano, por el contrario los BALB/c sucumben ante la infección con el inóculo alto. En resumen, de acuerdo a nuestros resultados no parece existir una relación directa entre supervivencia y parasitemia. Sin embargo sí parece haber cierta relación con la carga parasitaria en corazón.

## **2. DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LOS DIFERENTES MODELOS DE INFECCION.**

En los modelos murinos las citoquinas inflamatorias juegan un papel central en la infección por *T. cruzi* regulando tanto la replicación del parásito como la respuesta inmunológica (Gutierrez y col., 2009). Las respuestas innata y adaptativa, desencadenadas

por el parásito y/o por moléculas derivadas de su superficie, conducen a una producción exacerbada de citoquinas inflamatorias durante la fase aguda (Bilate & Cunha-Neto, 2008).

En nuestro caso, la concentración sistémica de IFN- $\gamma$  en el suero de los ratones infectados con el inóculo bajo, fue mucho más elevada en BALB/c en comparación con C57BL/6. Los valores circulantes de IFN- $\gamma$  fueron menores en el caso del inóculo alto a pesar de tener niveles similares de parasitemia en BALB/c. Sin embargo, en C57BL/6 los niveles de IFN- $\gamma$  fueron similares a pesar de existir en este caso diferencias en la parasitemia entre inóculo alto y bajo. Estos resultados son sorprendentes por 2 motivos: 1) Las cepas BALB/c y C57BL/6 se han considerado como productores de citoquinas Th2 y Th1, respectivamente, estando los C57BL/6 asociados a una mayor producción de IFN- $\gamma$  en otras enfermedades muy similares como la Leishmaniasis (Fresno y col., 1997), 2) IFN- $\gamma$  se requiere para la resistencia a la infección por *T. cruzi* (Muñoz-Fernández y col., 1992), siendo los animales deficientes en el receptor de IFN- $\gamma$  altamente susceptibles a la infección. Sin embargo, la elevada producción de IFN- $\gamma$  también se ha asociado en humanos a patología (Gomes y col., 2003). Es muy posible que IFN- $\gamma$  y por extensión las células Th1 desempeñen un papel dual en la infección, siendo necesarias para la eliminación del parásito, pero que si no se controlan resulta en patología por una excesiva inflamación. Una diferencia importante entre ambas cepas de ratón fue el incremento sistémico continuo de IL-6 en BALB/c, no así en C57BL/6 que decae con la disminución de la parasitemia. Posiblemente, por ser la IL-6 una citoquina ambivalente de fase aguda, podría estar asociada con la mortalidad de los ratones BALB/c. Alternativamente podría ser una consecuencia indirecta de una resolución de la infección menos eficiente en BALB/c respecto a C57BL/6. Por otro lado los ratones C57BL/6 presentaron concentraciones de IL-10 más elevadas en suero que BALB/c, que aumentó a medida que se controlaba la infección. Teniendo en cuenta que la IL-6 inhibe la respuesta T reguladora y favorece la Th17, y que la IL-10 es una citoquina inmunomoduladora producida entre otras por T reg, cabría esperar que la respuesta T reguladora en la fase aguda estuviera incrementada en ratones C57BL/6, como así parece ocurrir.

Durante las infecciones que inducen una respuesta sostenida Th1, las propias células Th1 también podrían contribuir a la limitación de la respuesta inmune y al daño tisular a

través de la liberación de IL-10 (Belkaid 2007). En efecto, en infecciones por protozoarios y en Leishmaniasis cutánea crónica, las células Th1 son las principales productoras de IL-10 (Anderson y col., 2007; Jankovic y col., 2007).

Posiblemente la magnitud de la producción de citoquinas en ratones BALB/c es responsable de las diferencias entre ambas cepas de ratón, pudiendo deberse en gran parte al IFN- $\gamma$  que permanece muy elevado a lo largo de la fase aguda.

El estudio de la producción de citoquinas *in vitro* por células de bazo mostró resultados similares a los observados en suero. Cabe destacar que los bazos de ratones BALB/c tanto no infectados como infectados presentaron un mayor número de células que los C57BL/6. Sin embargo los C57BL/6 infectados presentaron 7,5 veces más células que los no infectados, mientras que en los BALB/c, esta relación fue de 4,38 veces. El incremento en el número total de los distintos tipos de células en bazo infectado fue similar en ambas cepas de ratón, a excepción de las células B cuyo número fue el doble en ratones BALB/c en comparación con C57BL/6. Es de destacar que proporcionalmente se encuentran más elevadas las células de estirpe mieloide CD11b<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup>. Estas células probablemente sean mieloides inmaduras con un fenotipo supresor (Goñi y col., 2002). El hecho de que proporcionalmente aumenten más en los bazos de animales C57BL/6 podría también apoyar una mayor regulación de la respuesta inmunológica inflamatoria potencialmente patogénica.

También observamos una mayor producción de citoquinas en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c no infectados estimulados con anti-CD3/anti-CD28 en comparación con C57BL/6, de mas de 10 veces de inducción para IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ , pero no para IL-5, IL-6, IL-17 y TNF- $\alpha$ . Estos datos son asimismo sorprendentes con lo descrito en la literatura pero encajarían con los mayores valores en suero sobretodo de IFN- $\gamma$ . Más interesante fue el observar en el sobrenadante de esplenocitos de ratones BALB/c infectados y estimulados *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28, una disminución gradual en la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-17 hasta 17 d.p.i. Esta disminución en la producción de citoquinas podría ser el resultado de la inmunosupresión inducida por IFN- $\gamma$  descrita en la fase aguda de la infección y mediada por células mieloides supresoras productoras de NO (Goñi y col., 2002; Dos Reis, 2000; Tarleton y col., 1988). De este modo,



en ratones BALB/c, en los que la producción de IFN- $\gamma$  fue más elevada, se produjo una disminución en IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17, pero no de IL-5 e IL-6. Por el contrario, en ratones C57BL/6, que producen mucho menos IFN- $\gamma$  tras la estimulación *in vitro*, se inhibe gradualmente la producción de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-17 hasta día 17 p.i., observándose una recuperación a 22 d.p.i. para todas las citoquinas a excepción de IFN- $\gamma$  que permanece inhibida respecto al control no infectado. Hay que tener en cuenta que las concentraciones calculadas para IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-4 en BALB/c podrían no ser muy precisas (pero definitivamente mas altas) que en los C57BL/6, al ser los valores calculados mayores que el valor mayor de la curva standard (>20.000 pg/ml). Además, en ratones no infectados a pesar del incremento notable en la producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con anti-CD3/anti-CD28, no se produjo una supresión en la producción de las demás citoquinas en ninguna de las dos cepas de ratón. Esto podría ser debido a que las células mieloides de bazo no infectado están en estado de reposo y no responden a IFN- $\gamma$ , no produciéndose mediadores de la supresión como el NO. Por el contrario, las células mieloides de bazo de ratones infectados, que se encuentran en gran número durante la fase aguda, tras la estimulación *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 responderían al IFN- $\gamma$  produciéndose NO que suprimiría la producción de otras citoquinas, entre ellas IL-2 lo que se traduce en una disminución de la proliferación (Goñi y col. 2002, Cuervo y col. sometido).

En el caso de los ratones C57BL/6 el mecanismo supresor no estaría tan claro, al observarse una disminución en la capacidad de producción de IFN- $\gamma$  en los ratones infectados a 17 d.p.i. Sin embargo, el hecho de que a 22 d.p.i. se recupere la producción de la mayor parte de citoquinas, a excepción de IFN- $\gamma$ , podría indicar que a ese día p.i. en ausencia de IFN- $\gamma$  no habría supresión. Además de la bajada en la producción de IFN- $\gamma$  a 22 d.p.i., la recuperación de la capacidad de producción de citoquinas podría deberse a que las células mieloides supresoras abandonaran el bazo para colonizar otros tejidos como el cardiaco (Swirski y col., 2009).

Por otra parte, investigaciones recientes han demostrado que el desarrollo normal y la exportación de los timocitos pueden ser alterados como resultado de una infección aguda. Durante la infección experimental con *T. cruzi*, ocurre una atrofia tímica severa debida

principalmente a la apoptosis cortical relacionada con la depleción de linfocitos inmaduros  $CD4^+CD8^+$ , sin embargo, los mecanismos no están completamente esclarecidos (Savino, 2006). Nuestros resultados han confirmado esos datos en ambas cepas de ratón, siendo este efecto claramente dependiente del inóculo pero no de la patología, cepa de ratón o niveles de citoquinas. Nuestros resultados mostraron una disminución gradual en el número de timocitos, siendo máxima a 17 d.p.i. para ambas cepas de ratón y ambos inóculos. Sin embargo, no observamos una relación entre la depleción y la severidad de la infección. Además, el número de  $CD4^+$  aumentó en BALB/c a 12 d.p.i. y luego disminuyó por debajo del control mientras que en C57BL/6 aumentó progresivamente a 12 y 17 d.p.i. por encima del número observado en el control no infectado. Esto es sorprendente si tenemos en cuenta la disminución de la celularidad observada en el timo durante la fase aguda de la infección y sugiere que además de la depleción de las DP existe un incremento en la diferenciación hacia  $CD4^+$  SP. El porcentaje de células  $CD4^+CD25^+$  en el timo de ambas cepas aumentó con la infección, siendo mayor en C57BL/6 a 17 d.p.i. coincidiendo con una mayor expresión de marcadores de células T reg como FOXP3 y FR4. En este sentido, a 17 d.p.i. en los ratones C57BL/6, infectados con el inóculo bajo se observaron resultados similares aunque el incremento en  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  y  $CD4^+CD25^+FR4^+$  fue 10 veces menor que con el inóculo alto. Estos resultados sugieren que los ratones C57BL/6 podrían generar mayor número de células T reg naturales para controlar la respuesta inmunológica que los BALB/c. Aunque se requieren investigaciones más detalladas, parecería que las células T reg tímicas de ratones C57BL/6 no expresan CTLA-4 como lo hacen las de BALB/c infectado.

Nuestros resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de Meis y col (2009) que sugieren la existencia de diferencias en la dinámica de la respuesta inmunológica frente a patógenos en los distintos órganos linfoides. Así, el timo y los ganglios mesentéricos sufren atrofia y depleción de linfocitos masiva, mientras que el bazo y los ganglios subcutáneos se expanden a causa de la activación/proliferación leucocitarias (De Meis J. y col., 2009).

### 3. INFILTRACION LEUCOCITARIA CARDIACA.

Estudios del infiltrado inflamatorio cardiaco durante la fase aguda de ratones infectados con *T. cruzi*, realizados en nuestro laboratorio, han caracterizado un tipo de células mieloides que son capaces de influir en la supervivencia del parásito y regular la

respuesta celular inflamatoria en el corazón (Cuervo y col., 2008). La respuesta local resulta en el reclutamiento de células fagocíticas que se encargan de eliminar el material endógeno o exógeno causante del daño. Este reclutamiento y la activación preferencial de subpoblaciones de linfocitos, juegan un papel importante en la patogenia de enfermedades infecciosas y autoinmunes. Debido a la cantidad de mediadores inflamatorios que participan en este proceso y la cantidad de células sobre las cuales estos influyen, se requiere una estricta regulación para su control efectivo. De acuerdo a nuestros resultados la expresión de marcadores linfoides y mieloides en el corazón de ratones infectados fue mayor en C57BL/6 que en BALB/c, indicando mayor infiltración leucocitaria. La infiltración máxima se detectó en ratones C57BL/6 infectados con el inóculo alto el día 12 p.i. mientras que con el inóculo bajo a 17 d.p.i. En ratones BALB/c infectados con el inóculo alto se observó una mayor expresión de CD4 y CD68 a 12 d.p.i. mientras que para el resto fue máxima a 17 d.p.i. Estos resultados sugieren que en ratones C57BL/6 se produce un mayor reclutamiento leucocitario en tejido cardíaco que en ratones BALB/c, a pesar de tener mayor carga parasitaria en corazón estos últimos. Esto indica que el antígeno no es determinante en el reclutamiento sino más bien sería debido a otros aspectos asociados a una respuesta inmunológica protectora más eficiente. Sin embargo, la cinética del proceso inflamatorio parece venir determinada por el inóculo empleado.

Cuervo y col. (2008) reportaron que en el corazón de ratones infectados por *T. cruzi*, se produce una respuesta mixta Th1/Th2, siendo el balance entre las respuestas Th1/Th2 más alto en la cepa menos susceptible C57BL/6 que en la cepa mas susceptible BALB/c. Nuestros resultados claramente confirman estos datos. En nuestra investigación observamos que en ratones BALB/c la mayor expresión de citoquinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-6) e inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-12) se produjo con ambos inóculos a 17 d.p.i, mientras que fue máxima en ratones C57BL/6 con inóculo bajo a 17 d.p.i y con inóculo alto a 12 d.p.i. Según lo reportado por Tarleton y col. (1992) y Dos Reis y col. (2005), las células linfocitarias T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> constituyen las dos principales subpoblaciones de linfocitos T  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> implicadas en el control de la infección por *T. cruzi* y en el desarrollo de mecanismos de inmunoprotección en el hospedador. En acuerdo con lo descrito por estos autores, nuestros resultados sugieren que durante la fase aguda el infiltrado inflamatorio está compuesto principalmente

por células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), sin embargo, también existe un importante número de células mieloides (CD11b<sup>+</sup>) y un pequeño número de células T reg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>FR4<sup>+</sup>) que podrían ejercer un papel supresor en corazón.

#### **4. EFECTO DE LA RESPUESTA REGULADORA EN C57BL/6 DURANTE LA FASE AGUDA DE LA INFECCION.**

Durante una infección parasitaria, la inmunoregulación puede surgir como un efecto atenuador de la respuesta inmune del hospedador al proceso parasitario, y/o puede ser inducida activamente por el parásito, como una estrategia de supervivencia. Belkaid (2007) propuso que el mecanismo de supresión y la naturaleza de las células T reguladoras involucradas en el proceso infeccioso, dependen de la intensidad y del estadio del ciclo patológico. Así, durante una infección aguda, cuando existe una expansión parasitaria persistente, las células T reg naturales policlonales podrían desempeñar un papel beneficioso para el hospedador al controlar la patología inducida por el parásito, o por el contrario, el control excesivo de la respuesta inmune efectora, podría conducir a un crecimiento descontrolado del parásito y a la eventual muerte del hospedador. Por otra parte, cuando el parásito es eliminado eficientemente por la respuesta inmune efectora durante la fase inicial de la infección, el hospedador podría morir debido a esta respuesta inmune descontrolada y en este caso la regulación inmune resultaría beneficiosa para el control de la inmunopatología (Belkaid y col., 2007).

La respuesta reguladora, puede ser llevada a cabo directamente a través de la inducción de citoquinas inmunomoduladoras del hospedador, tales como IL-10 y el TGF-β, producidas por células de la respuesta inmune innata contra las moléculas derivadas del patógeno, o bien, indirectamente a través de la generación de células T reg (Belkaid, 2007). Por otra parte, Yoshida y col., (2007), han sugerido que la citoquina IL-17 podría desempeñar un papel importante en la resolución de la infección experimental por *T. cruzi* mediante la inducción de inflamación y posiblemente a través de la inducción de péptidos antimicrobianos con actividad parasitocida. Sin embargo, en nuestros resultados, no parece haber una relación en los diferentes modelos entre la producción de IL-17 y el control de la infección o la patología asociada. Observamos mayor producción local de IL-17 en corazón de animales BALB/c infectados a pesar de tener mayor patología y mayor carga parasitaria.

Esto podría deberse a una mayor producción local de IFN- $\gamma$  que suprimiría la actividad de las células Th17 en C57BL/6. Apenas existen estudios acerca del papel de las células Th17 en la infección por *T. cruzi*. Recientemente se ha descrito que el tratamiento de infecciones con anticuerpo anti-IL-17 incrementa la miocarditis y la mortalidad aunque disminuye la carga parasitaria en corazón en la fase aguda (da Matta y col., 2010). Estos autores lo atribuyen a un incremento de la respuesta Th1 que en parte estaría de acuerdo con nuestros resultados que relacionan la exacerbación de la respuesta Th1 con patogenicidad.

De acuerdo a nuestros datos, la alta carga parasitaria presente en el tejido cardíaco de BALB/c inoculados con 2.000 parásitos, aunada al efecto deletéreo de la elevada respuesta inmune efectora producida para eliminar el parásito, podría haber ocasionado la muerte de estos animales durante las primeras semanas de infección. La escasa respuesta inmune reguladora observada, nos sugiere la poca o ninguna contribución de ésta en el control de la patología. El efecto patogénico de la respuesta inmune efectora cardíaca se vio atenuado al disminuir el inóculo en BALB/c y cierto porcentaje de animales sobrevivió a la fase aguda inicial, al igual que ocurre en la enfermedad de Chagas en humanos. No obstante, la respuesta inmune reguladora también fue escasa durante el período estudiado, por lo que no podemos atribuir ningún papel a esta población celular que podría resultar beneficioso para prolongar la vida de estos animales.

Interesantemente, pese a la mayor inflamación cardíaca detectada en la cepa menos susceptible, todos los C57BL/6 lograron sobrevivir a la infección independientemente del inóculo. En este sentido, los resultados sugieren que la presencia de mayor número de células T reg en el grupo C57BL/6 podría tener un efecto beneficioso para la supervivencia de estos ratones en la fase aguda. La presencia de células T reg en el corazón de estos animales, evidenciada por el hallazgo de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> asociadas a los marcadores FOXP3 y FR4, estaría atenuando la respuesta Th1 y la producción de IFN- $\gamma$  y NO, lo que también podría relacionarse con un control de la carga parasitaria en corazón más eficiente en ratones C57BL/6.

De igual forma, observamos una tendencia al aumento de la expresión de marcadores de células T reg en el tejido cardíaco de los ratones infectados, mayor en

C57BL/6 que en BALB/c. La mayor inducción se observó a 17 d.p.i en ratones BALB/c de forma independiente al inóculo, mientras que en C57BL/6 se observó a 17 d.p.i con inóculo bajo y a 12 d.p.i con inóculo alto (similar a lo observado para la expresión de marcadores linfoides/mieloides y citoquinas). Teniendo en cuenta que en el timo de ratones C57BL/6 infectados aumentan las células T reg, es posible que las células T reg del infiltrado inflamatorio cardiaco se hubieran originado en periferia, tratándose posiblemente de células iTregs. Sin embargo, estos resultados son preliminares y deberán continuarse en el futuro.

Considerando los datos de parasitemia, carga parasitaria en tejido cardiaco y supervivencia de los ratones, los resultados sugieren que un reclutamiento más eficiente y temprano de células T reg observado en ratones C57BL/6 estaría asociado a un mejor pronóstico en la evolución de la infección durante la fase aguda de la enfermedad. Aproximadamente un 70% de las células CD4<sup>+</sup> aisladas a 17 d.p.i de corazón de ratones C57BL/6 infectados con inóculo bajo fueron positivas para CD25, siendo éste un marcador de activación T y de células T reg. A la vista de los resultados, en el infiltrado inflamatorio en corazón la mayoría de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son células T activadas, existiendo un pequeño porcentaje de células T reg (12%) positivas para FOXP3 y FR4.

Existen evidencias en pacientes sobre el papel beneficioso de las T reg en la progresión de la infección controlando la activación de las células T CD8 en pacientes chagásicos (Vitelli-Avelar y col., 2005; Araujo y col., 2007). Estas células T reg circulantes se asocian a la producción de IL-10 pero no expresan CTLA-4, ambos efectos observados en C57BL/6 (poco susceptible) y no en BALB/c (altamente susceptible).

Por el contrario, en modelos experimentales de infección con *T. cruzi* se ha descrito que ratones infectados el tratamiento con anti-GITR produce un aumento de la miocarditis y reclutamiento leucocitario en la fase aguda (Mariano y col., 2008). Sin embargo, otros autores han encontrado un papel limitado de las células T reg, aunque utilizaron anticuerpo anti-CD25 para deplecionar las células T reg, que evidentemente elimina también a muchos otros tipos de células T activadas (Sales y col., 2008; Kotner & Tarleton, 2006).

La prueba mas apropiada para determinar si una célula es supresora, es constatar su función supresora en experimentos *in vitro*. En este sentido, las células CD4<sup>+</sup> aisladas de

corazón de ratones C56BL/6 fueron capaces de suprimir la proliferación de esplenocitos de ratón no infectado *in vitro*. Teniendo en cuenta que un pequeño porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> corresponde a células T reg, los resultados sugieren que el mecanismo de supresión, en este ensayo *in vitro*, estaría mediado por las células T reg, demostrando por primera vez la existencia *in situ* de células T reg en la infección por *T. cruzi*. Experimentos similares llevados a cabo en nuestro laboratorio mostraron que las células mieloides CD11b<sup>+</sup> purificadas del infiltrado inflamatorio cardiaco de ratones BALB/c fueron capaces también de suprimir la proliferación de linfocitos T (Cuervo y col., sometido). Es posible que ambas poblaciones, mieloides y T reg, contribuyan al balance y control de la respuesta inmunológica evitando que las respuestas protectoras se conviertan por excesivas en patogénicas.

Es importante mencionar que la proliferación de las células CD4<sup>+</sup> purificadas de corazón tras la activación con anti-CD3/anti-CD28 se vio suprimida en las condiciones estudiadas, teniendo en cuenta que la mayoría de las células CD4<sup>+</sup> son CD25<sup>+</sup>, es decir activadas, es posible que no respondan al estímulo adicional al que las sometemos, o que la pequeña proporción de células T reg sea capaz de suprimir la proliferación. Una hipótesis alternativa es que la presencia del parásito *T. cruzi* o moléculas derivadas del parásito en el tejido infectado sean capaces de mediar la supresión de la proliferación. Sin embargo, esto es bastante improbable, teniendo en cuenta que las células CD4<sup>+</sup> se aislaron mediante selección positiva con CD4-Microbeads, procedimiento que resulta en una alta pureza de las células aisladas (>95%), y que uno de los pocos tipos celulares que el parásito no puede infectar es el linfocito. A pesar de ello, en el futuro se realizarán experimentos encaminados al estudio de esta hipótesis. En este sentido Alcaide & Fresno (2004) reportaron que la proteína Ag-C10, una mucina de la membrana de *T. cruzi*, inhibió la proliferación de células T *in vitro* a través de la inhibición de IL-2.

Como hemos mencionado anteriormente nuestros resultados muestran que los ratones C57BL/6 presentan un perfil de expresión de citoquinas Th1 e inflamatorias más elevado en el infiltrado cardiaco que los ratones BALB/c. Asimismo, la presencia de células T reg en corazón fue detectada en ratones C57BL/6 y no en BALB/c. Se ha sugerido que las células Th17 y las células T reg comparten vías de desarrollo recíprocas durante la patogénesis o control de la inflamación, debido a que ambas requieren TGF- $\beta$  (McGeachy &

Cua, 2008). Por ello, estudiamos la expresión de citoquinas y factores de transcripción característicos de cada tipo celular en ambos modelos de ratón con inóculos alto y bajo en el tejido cardíaco. Los resultados muestran la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$  en todos en los días de infección estudiados. Sin embargo, la expresión de IL-17 fue detectada de forma significativa en ratones BALB/c y no C57BL/6. Este sería el único dato que apoyaría el papel de las células Th17 en patología/susceptibilidad a la infección, aunque como se ha mencionado anteriormente podría ocurrir que la elevada producción de IFN- $\gamma$  en corazón de C57BL/6 fuese responsable de una mayor inhibición de Th17 en esta cepa respecto a BALB/c. Por el contrario, la magnitud de la expresión de factores de transcripción asociados a células Th17 fue parecida en ambas cepas de ratón, ROR $\gamma$ t y STAT3 se expresaron de forma significativa en ratones BALB/c con inóculo bajo y C57BL/6 con ambos inóculos durante la fase aguda.

## 5. DESARROLLO DE LA INMUNOPATOLOGIA DURANTE LA FASE CRONICA.

El daño cardíaco durante el desarrollo de la fase crónica podría ser el resultado de la respuesta inmune efectora producida por la persistencia del parásito en los tejidos (Tarleton and Zhang, 1999) aunado a la respuesta autoinmune adicional que podría ser conducida por un mimetismo molecular entre el parásito y auto-antígenos (Kierszembbaum, 2005), o por liberación y presentación de auto-antígenos derivados del daño celular (Girones and Fresno, 2003; DosReis et al., 2005; Girones et al., 2007). De acuerdo a lo referido por Gutierrez y col. (2009) la cardiopatía chagásica es el resultado de un proceso inflamatorio, caracterizado por un gran número de células inflamatorias en el miocardio. Este infiltrado celular inflamatorio podría originarse en respuesta al tropismo cardíaco del parásito o bien como una consecuencia de una tolerancia inmunológica alterada. Aunque existe controversia al respecto, Gutierrez (2009) indica que, efectivamente la respuesta inflamatoria depende de la constitución genética del hospedador ya que algunas personas nunca desarrollan la enfermedad cardíaca a pesar de estar infectados con *T. cruzi*.

Independientemente del modelo experimental empleado, demostramos la presencia del parásito o de su ADN en el tejido cardíaco de todos los ratones crónicos BALB/c y C57BL/6. Este hecho nos sugiere que en los animales supervivientes a la fase aguda, la



respuesta inmunológica efectora no fue capaz de eliminar completamente al parásito, así mismo, la respuesta reguladora parece haber desempeñado un papel beneficioso en el control del daño tisular debido a la proliferación del parásito y a la respuesta efectora producida para eliminarlo.

Nuestros resultados mostraron que la expresión génica de marcadores linfoides y mieloides en ratones infectados con *T. cruzi* en fase crónica reveló una prevalencia significativa de CD8 en ambas cepas de ratón, siendo mucho mas elevada en ratones BALB/c que en C57BL/6 (20 frente a 3-4 veces de inducción, respectivamente). Este hecho podría tener alguna relación con una mayor replicación del parásito en ratones BALB/c en fase crónica o bien deberse a la autoreactividad generada por la destrucción tisular o el reconocimiento de autoantígenos cardiacos (mayor en BALB/c) como han descrito varios autores que atribuyen un papel a la autoinmunidad en la patología crónica (Girones y col. 2003, 2005). No se detectaron valores significativos de células T reg infiltrantes en corazón en fase crónica. Sin embargo, la expresión génica de citoquinas no se correlacionó claramente con la composición del infiltrado, observándose una mayor expresión de IFN- $\gamma$  en ratones C57BL/6 con inóculo alto (25 veces de inducción), mientras que TNF- $\alpha$  fue mayor en BALB/c. Por otro lado se detectó una baja expresión génica de IL-1 $\alpha$  e IL-2 (1-4 veces de inducción) sin claras diferencias entre las dos cepas de ratón. Por último, las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$  se expresaron más en ratones BALB/c que en C57BL/6 independientemente del inóculo. Estos resultados indican que en la fase crónica de la enfermedad, la infiltración cardiaca es mayor en ratones BALB/c, lo cual esta posiblemente relacionado con una mayor carga parasitaria. Sin embargo, en el corazón de estos ratones predominaron citoquinas reguladoras, siendo la IL-10 la más inducida, mientras que en C57BL/6 fue predominante la expresión de IFN- $\gamma$ .

A nivel sistémico los valores obtenidos pueden estar alterados por el efecto de la edad de los ratones (hasta 245 d.p.i.), ya que detectamos ciertos valores basales altos en ratones controles. No obstante siguió observándose un valor de IL-6 mayor en BALB/c que en C57BL/6. En cualquier caso un dato que resulta bastante provocador es encontrar que la infección aguda por *T. cruzi* altera los balances de las respuestas inmunológicas, especialmente las respuestas Th1/Th2/Th17, y estas alteraciones permanecen a lo largo del

tiempo a pesar de una discreta por no decir casi nula presencia de parásitos en la fase crónica . Esta elevación de citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 o incluso IL-5 indicaría que el balance de las subpoblaciones anteriores ha quedado profundamente alterado en la fase aguda y que se va consolidando según pasa el tiempo, bien por envejecimiento o bien por la continua presencia del parásito o autoantígenos o ambos.

Estos datos requieren mayores estudios para su confirmación, pero es conveniente destacar que los pacientes chagásicos presentan elevados niveles de IFN- $\gamma$  (Gomes y col., 2003).

En resumen nuestros resultados aunque en muchos casos preliminares indican una compleja interacción entre los parásitos y el sistema inmunológico del hospedador que altera el balance de las diferentes respuestas efectoras y reguladoras. También hemos realizado un análisis exhaustivo por primera vez de las células T reg incluyendo las realmente infiltrantes en corazón que sugiere un papel beneficioso de estas en evitar la patología asociada.

## VI. CONCLUSIONES.

1. Los distintos modelos experimentales nos permitieron reproducir las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en humanos. Se observó que la supervivencia de los ratones BALB/c está asociada a una menor carga parasitaria en el corazón. Además se constató que la constitución genética del hospedador es determinante en la supervivencia, el control de la infección y el desarrollo de la patología cardíaca.
2. En la fase aguda de la infección, el balance de citoquinas circulantes y las producidas *in vitro* mostró niveles mayores de IFN- $\gamma$  en los ratones BALB/c. Estos ratones mostraron una alta concentración de IL-6 circulante que parece estar asociada con una mayor susceptibilidad a *T. cruzi*. Mientras que la citoquina reguladora IL-10 estuvo asociada con la menor susceptibilidad de los ratones C57BL/6.
3. La severa atrofia tímica detectada fue reversible tras la fase aguda y no estuvo asociada al genotipo del hospedador ni a los niveles sistémicos de citoquinas, ni a la parasitemia, pero si al inóculo inicial. Los ratones C57BL/6 presentaron mayor número de células T reg naturales que los BALB/c en la fase aguda de la infección.
4. Durante la fase aguda, la expresión de marcadores leucocitarios, citoquinas Th1 y células T reg del corazón en ratones C57BL/6 fue mayor que en los BALB/c. La presencia de células T reg podría atenuar la posible inmunosupresión debida a una exacerbada producción de IFN- $\gamma$ , resultando en una disminución de la carga parasitaria cardíaca en los C57BL/6.
5. La mayor expresión génica de IL-17 observada en corazón de ratones BALB/c en fase aguda en comparación con los ratones C57BL/6 no fue acompañada por la expresión de otros marcadores de células Th17 por lo que no parece existir una asociación de las células Th17 y el control de la infección.
6. Las células CD4<sup>+</sup> purificadas de corazón de ratones C57BL/6 infectados en fase aguda presentaron un pequeño porcentaje de células T reg que fue capaz de inhibir la

proliferación de esplenocitos estimulados *in vitro* con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, evidenciándose por primera vez su papel inmunosupresor.

7. En la fase crónica la carga parasitaria en el tejido cardíaco fue mayor en los ratones BALB/c en comparación con los C57BL/6, sugiriendo una respuesta antiparasitaria más eficiente en los últimos.
8. A nivel sistémico, en la fase crónica tardía, ambas cepas de ratón presentaron altos niveles de IFN- $\gamma$  con el inóculo bajo, y mayor producción de IL-6 en los BALB/c que en los C57BL/6, al igual que durante la fase aguda de la infección.
9. En la fase crónica de los ratones BALB/c con inóculo bajo, se observó mayor expresión de CD8 y citoquinas Th1 en tejido cardíaco que en los ratones C57BL/6, así como también de la citoquina reguladora IL-10, sugiriendo la presencia de mecanismos reguladores distintos a las T reg, que no fueron detectados.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- Alarcón de Noya, B. Z. Díaz-Bello, y col. (2010). "Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela." J Infect Dis **201**(9):1308-15.
- Anderson, C. F., M. Oukka, y col. (2007). "CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis." JEM **204** (2):285-97.
- Andersson, J., A. Örn, D. Sunnemark (2003). "Chronic murine Chagas's disease: the impact of host and parasite genotypes." Immunol Letters **86**: 207-12.
- Andrade, Z. (1999). "Immunopathology of Chagas disease". Mem Inst Oswaldo Cruz **94**(Suppl 1): 71-80.
- Andrade, Z. (2000). "Patologia da Doença de Chagas." En Brener, Z., Z. A. Andrade, M. Barretto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil p. 200-30.
- Araujo, F. F., J. A. Gomes, y col. (2007). "Potential role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease." Front Biosci **12**: 2797-806.
- Belkaid, Y. (2007). "Regulatory T cells y infection: a dangerous necessity." Nat Rev Immunol **7**(11): 875-88.
- Belkaid, Y. (2008). "Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection." Eur J Immunol **38**(4): 918-21.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, y col. (2002). "CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania* major persistence y immunity." Nature **420**(6915): 502-7.
- Belkaid, Y., R. B. Blank, y col. (2006). "Natural regulatory T cells y parasites: a common quest for host homeostasis." Immunol Rev **212**: 287-300.

- Benavides, F. & J. L. Guenet (2001). "Murine Models for humans diseases." Medicina **61** (2): 215-31.
- Bilate A. M. B., M. C. Vera y col. (2003). "The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis". Microb and Infect **5**: 1116–24.
- Bilate, A. M. & E. Cunha-Neto (2008). "Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **50**(2): 67-74.
- Bittencourt, A. L. (2000). "Transmissão vertical da doença de Chagas." En Brener, Z., Z.. A. Andrade, M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil p. 16-20.
- Brener, Z. (1962). "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **4**: 389-96.
- Brener, Z. (1992). "*Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle." En Wendel y col., (1992). Chagas disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92. São Paulo, Brasil. p. 13-29.
- Brener, Z., Z. Yrade, y col. (2000). " En Brener, Z., Z.. A. Andrade, M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil p. 200-30.
- Brüstle, A, S. Heink y col. (2007). "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4." Nat Immunol **8**(9):958-66.
- Cardoni, R. L., M. I. Antunez, A. A. Abrami (1999). "Respuesta Th1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*." Medicina **59 (Supl. II)**: 84-90.
- Carod-Artal, F. C. & J. Gascon (2010). "Chagas disease and stroke." Lancet Neurol **9**: 533–42.
- Chen, Q. & W. Yang (2008) "IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of irf-4 transcription factor." Immunity **29**: 899-911.

- Cuervo, H., M. A. Pineda, y col. (2008). "Inducible nitric oxide synthase y arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages." J Infect Dis **197**(12): 1772-82.
- Da Matta Guedes, P. M., F. R. Gutierrez y col. (2010). "IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis." PLoS Negl Trop Dis **4**(2):e604.
- De Meis, J., A. Morrot, y col. (2009). "Regional immune response in Chagas disease." Plos Negl Diseases **3**(7): 1-9.
- De Souza, W. (2000). "O parasito e sua interaçao com os hospedeiros." En Brener, Z., Z. A. Andrade, M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil p. 88-126.
- Dos Reis, G. (2000). "A resposta immune celular na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*." En: Araujo-Jorge TC & Castro SL. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. Editora FIOCRUZ. Rio de Janeiro, p. 48-50.
- Dos Reis, G. & M. A. Lopes (2000). "A resposta Imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* en modelos experimentais. " En Brener, Z., Z. A. Andrade, Z. A., M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S.A. Río de Janeiro, Brasil. p. 153-169.
- Dos Reis, G. A., C. G. Freire-de-Lima, y col. (2005). "The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease." Trends Parasitol **21**(5): 237-43.
- Dos Reis, G. A., M. E. Fonseca, y col. (1995). "Programmed T-cell death in experimental chagas disease." Parasitol Today **11**(10): 391-4.
- Fresno M., M. Kopf, L. Rivas (1997). "Cytokines and infectious diseases." Immunol Today **18**(2):56-8.
- Fu J. L., D. P. Xu y col. (2006). "The characterization of regulatory T cells in peripheral blood of HBV-infected patients". Zhonghua Yi Xue Za Zhi. **86**(22): 1522-5.

- Fuenmayor, C., M. L. Higuchi, y col., (2005). "Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate y its relationship with T. cruzi parasitic antigens." Acta Cardiol **60**(1): 33-7.
- Gascon J, C. Bern, M. J. Pinazo (2009). "Chagas disease in Spain, the United States y other non-endemic countries." Acta Trop **115**(1-2): 22-27.
- Girones, N. y M. Fresno (2003). "Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?." Trends Parasitol **19**(1): 19-22.
- Girones, N., E. Carrasco-Marin, y col. (2007). "Role of Trypanosoma cruzi autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology." Ann N Y Acad Sci **1107**: 434-44.
- Girones, N., H. Cuervo, M. Fresno (2005). "*Trypanosoma cruzi* induce molecular mimicry." Curr Top Microbiol Immunol **296**: 89-123.
- Gomes J. A., L. M. Bahia-Oliveira y col. (2003). "Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response." Infect Immun **71**(3):1185-93.
- Goñi, O., P. Alcaide, M. Fresno (2002). "Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1+)CD11b+ immature myeloid suppressor cells." Int Immunol **14**(10): 1125-34.
- Gutierrez, F. R., P. M. Guedes, y col. (2009). "The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease." Parasite Immunol **31**: 673-85.
- Higuchi, M.L.; L. A. Benvenuti y col. (2003) -"Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. " Cardiovasc Res **60**: 96-107.
- <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>
- Ivanov, Il, B. S. McKenzie, y col. (2006). "The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-33.



- Jankovic, D., M. C. Kullberg, y col. (2007). "Conventional T-bet+Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection." JEM **204**(2): 273–83.
- Jonuleit, H. & E. Schmitt (2003). "The regulatory T cell family: distinct subsets y their interrelations." J Immunol **171**(12): 6323-7.
- Kierszenbaum, F. (2005). "Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?." Trends Parasitol **21**(11): 513-6.
- Kierszenbaum, F. (2007). "Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease." Acta Parasitol **52**(1): 1-12.
- Kotner, J. & R. Tarleton (2007). "Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice." Infect Immun **75**(2): 861-9.
- Marcon, G. E., P. D. Andrade, y col. (2002). "Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies." Diagn Microbiol Infect Dis **43**(1): 39-43.
- Mariano, F. S., F. R. Gutierrez, y col. (2008). "The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection." Microbes Infect **10**(7): 825-33.
- Marinho C. R. F., M. R. D'Imperio y col. (1999). "Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease." Infect Immun **67**(1): 308–318.
- Marinho, C. R. F., Z. D. Bucci, y col. (2004). "Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease." Infec Immun **72**(4):2350–7.
- Marin-Neto, J. A., E. Cunha-Neto, y col. (2007). "Pathogenesis of chronic Chagas heart disease." Circulation **115**(9): 1109-23.
- McGeachy, M. J. & D. J. Cua (2008). "Th17 cell differentiation: the long y winding road." Immunity **28**(4): 445-53.

- Miles, M. A., A. Souza, y col. (1978). "Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas's disease in Amazonian Brazil." Nature **272**: 819-21.
- Mills K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?." Nat Rev Immunol **4**: 841-55.
- Miyara, M. & S. Sakaguchi (2007). "Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression." Trends Mol Med **13**(3): 108-16.
- Mosmann T. R. & S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today **17**:138-46.
- Muñoz-Fernández M. A., M. A. Fernández, M. Fresno (1992). "Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism." Immunol Lett **33**(1):35-40.
- Nuviera, R. & Ch. Dong (2008). "Keeping autoimmunity in check: How to control a Th17 cell controller". Immunity **29**: 841-43
- Parada, H., H. A. Carrasco, y col. (1997). "Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological y histopathological study." Int J Cardiol **60**(1): 49-54.
- Pérez de Ayala A., J. A. Pérez-Molina y col. (2009). "Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain." Emerg Infect Dis **15** (4):607-8.
- Pinto Dias, J. C. (2000). "Epidemiologia." En Brener, Z., Z. A. Andrade, M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil p. 48-74.
- Piron, M., R. Fisa y col. (2007). "Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples." Acta Trop **103**(3): 195-200.
- Rassi A. Jr, A. Rassi, J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet **375**: 1388–402.

- Roark, C. L., P. L. Simonian, y col. (2008). "gamma-delta T cells: an important source of IL-17." Curr Opin Immunol **20**(3): 353-7.
- Roncarolo, M. G. & S. Gregori (2008). "The validity of Foxp3 to define human and mouse regulatory T cells, Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells?." Eur. J. Immunol **38**: 901–37.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self y non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, y col. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Sales, P. A., Jr., D. Golgher, y col. (2008). "The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*." Microbes Infect **10**(6): 680-8.
- San Segundo, D., G. Benito, y col. (2007). "Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: Efecto de la inmunosupresión farmacológica." Inmunología **26**(3).
- Sathler-Avelar, R., D. M. Vitelli-Avelar, y col. (2009). "Innate immunity y regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(4): 246-51.
- Savino, W. (2006). "The thymus is a common target organ in infectious diseases." PLoS Pathog **2**(6): e62.
- Scharfstein, J., J. de Assis Silva Gomes, R. Correa-Oliveira (2009) "Back to the future in Chagas disease: from animal models to patient cohort studies, progress in immunopathogenesis research." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 (Suppl 1)**: 187-198.
- Schmuñis, G. A. (2000). "A Trypanosomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas". En Brener, Z., Z.. A. Andrade, M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil. p. 1-15.

- Schmuñis, G. A. (2007). "Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration." Mem Inst Oswaldo Cruz. **102 (Suppl. I)**: 75-85.
- Serrano-Hernández, A. (2009). "Células colaboradoras (TH1,TH2,TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide". Reumatol Clin **5** (S1): 1-5.
- Sherlock, I. A. (2000). "Vectores." En Brener, Z., Z. A. Andrade, M. Barra-Netto. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S. A. Río de Janeiro, Brasil p. 21-40.
- Stockinger, B., M. Veldhoen, K. Hirota (2009). "Modulation of Th17 development and function by activation of the aryl hydrocarbon receptor--the role of endogenous ligands." Eur J Immunol **39**(3): 652-4.
- Swirski, F. K., M. Nahrendorf y col. (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." Science **325**: 612-6.
- Tarleton, R. L. & L. Zhang (1999). "Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?" Parasitol Today **15**(3): 94-9.
- Tarleton, R. L., B. H. Koller, y col. (1992). "Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection." Nature **356**(6367): 338-40.
- Tarleton, R. L., M. J. Grusby, y col. (1996). "*Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- y class II-restricted T cells in immune resistance y disease." Int Immunol **8**(1): 13-22.
- Tarleton, R. L., P.P. de Andrade, C. R. de Andrade (1988). "Interleukin 2 production in patients with Chagas`disease: correlation with anti-parasite antibody responses." Immunol Letters **17** (3): 229-34.
- TDR/SWG/09 (2007). "Reporte sobre la enfermedad de Chagas." 1-45.
- Texeira, A. R. L., R. J. Nascimento, R. N. Sturm (2006). "Evolution and pathology in Chagas disease – A review." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(5):463-91.

- Vallejo, G.A., F. Guhl, G.A. Schaub (2009). "Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector–parasite interactions." Acta trop **110**(2-3):137-47.
- Venegas, J., W. Coñoepan y col. (2009). "Differential distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in human chronic chagasic cardiopathic and non-cardiopathic individuals." Acta Trop **109**: 187-93.
- Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar y col. (2005). "Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25<sup>High</sup> regulatory T lymphocytes." Scand J Immunol **62**(3):297-308.
- Wei, G. & H. Tabel (2008). "Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis." J Immunol **180**(4): 2514-21.
- WHO (2002). "Control of Chagas Disease." (905).
- WHO (2005). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina.
- Wynn, T. (2005). "TH-17: a giant step from TH1 and TH2." Nat Immunol **6** (11): 1069-70.
- Yoshida, H., Y. Miyazaki, y col. (2007a). "Regulation of Defense Responses against Protozoan Infection by Interleukin-27 y Related Cytokines." J Biomed Biotechnol **2007**(3): 1-7.
- Yoshida, H., Y. Shimano, y col. (2007b). "Interleukin-17 is Required for Protection Against *Trypanosoma cruzi* Through Induction of Inflammatory Responses." Cytokine (Book of Abstracts) **39**: 46.
- Zhang, L. & R. Tarleton (1999). "Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas` disease." J Infect Dis **180**: 480-6.



## APENDICES.

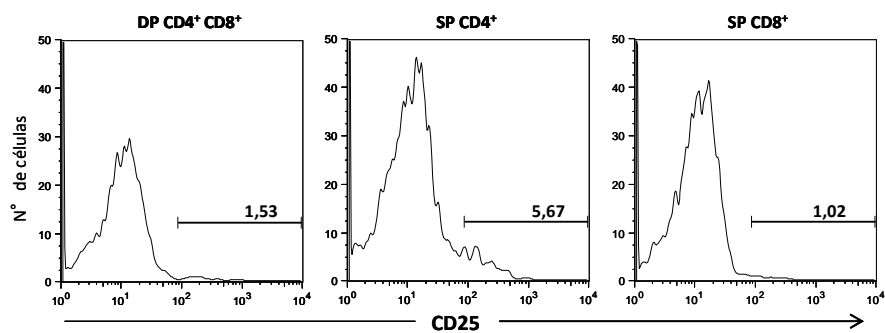


Figura *i*. Subpoblaciones celulares en el timo de ratones C57BL/6 inoculados con 50 parásitos, en fase aguda (17 d.p.i.).

# Role of *Trypanosoma cruzi* Autoreactive T Cells in the Generation of Cardiac Pathology

NÚRIA GIRONÈS,<sup>a</sup> EUGENIO CARRASCO-MARIN,<sup>b</sup> HENAR CUERVO,<sup>a</sup> NÉSTOR ADRIÁN GUERRERO,<sup>a</sup> CRISTINA SANOJA,<sup>a</sup> JOHN SPARROW,<sup>c</sup> REYES FLORES-HERRÁEZ,<sup>d</sup> LORENA FERNÁNDEZ-PRIETO,<sup>b</sup> ISABEL CHICO-CALERO,<sup>a</sup> HUGO SALGADO,<sup>a</sup> JAVIER CARRIÓN,<sup>a</sup> AND MANUEL FRESNO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

<sup>c</sup>Glaxo SmithKline, Tres Cantos, Madrid, Spain

<sup>d</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

**ABSTRACT:** Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects several million people in Central and South America. About 30% of chronic patients develop cardiomyopathy probably caused by parasite persistence and/or autoimmunity. While several cross-reactive antibodies generated during mammal *T. cruzi* infection have been described, very few cross-reactive T cells have been identified. We performed adoptive transfer experiments of T cells isolated from chronically infected mice. The results showed the generation of cardiac pathology in the absence of parasites. We also transferred cross-reactive SAPA-specific T cells and observed unspecific alterations in heart repolarization, cardiac inflammatory infiltration, and tissue damage.

**KEYWORDS:** *T. cruzi*; autoreactive T cells; autoimmunity; Chagas disease

## INTRODUCTION

Chagas disease is a debilitating multisystemic disorder that affects several million people (approximately 18 million individuals are infected with

Address for correspondence: Manuel Fresno, Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. Voice: 34-91-3978413; fax: 34-91-3974799.

mafresno@cbm.uam.es

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1107: 434–444 (2007). © 2007 New York Academy of Sciences.  
doi: 10.1196/annals.1381.046



*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), with 120 million at risk) in Central and South America.<sup>1-4</sup> It is caused by the flagellated protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, with a complex life cycle involving several stages in both vertebrates and insect vector.<sup>2,5</sup> Individuals residing in rural areas of Latin America are at highest risk of infection. The World Health Organization has conducted several programs for the elimination of the insect vector, with high impact in reducing the incidence of new infections.<sup>4</sup> On the other hand, transfusion-acquired Chagas disease is becoming a significant health problem in countries other than Central and South America, especially those receiving high numbers of immigrants from that region.<sup>6-8</sup>

Two phases, acute and chronic, can be differentiated in Chagas disease.<sup>2,3,9</sup> In the acute phase, encompassing few weeks after infection, a local inflammatory lesion appears at the site of infection where the parasite undergoes the first rounds of replication. After parasite dissemination through the body, circulating blood trypomastigotes are easily observed in blood and a small number of patients develop symptoms of severe myocarditis, leading, in some instances, to heart failure responsible for the few deaths in acute Chagas disease.<sup>10,11</sup> However, the acute phase mostly remains undiagnosed without severe clinical symptoms. On the contrary, the severe pathology and the most common manifestations of this disease develop many years (10–30) after the initial infection with *T. cruzi* in the so-called chronic phase, in 30–40% of the infected people.<sup>2,3,9</sup> During the chronic phase, circulating parasites cannot be observed by inspection of blood but progressive tissue damage occurs involving the esophagus, colon, and heart.<sup>2,3</sup> Treatment with benznidazol or nifurtimox is effective during the acute phase of infection, specially in newborns,<sup>12,13</sup> but usually no treatment is prescribed for the chronic phase.<sup>2,3</sup> Several treatment<sup>14-18</sup> and vaccination<sup>19-23</sup> trials have been conducted, but to date an effective therapy or vaccine is still lacking.

Pathology during chronic *T. cruzi* infection is postulated to be caused by parasite persistence or autoimmunity or by a combination of both mechanisms.<sup>24-26</sup> Understanding T cell responses during infection is crucial in the development of efficient vaccines to avoid unwanted secondary effects. To date there is no systematic assay to study immunodominant T cell responses in infection. Some peptide candidates are being tested for protection and/or pathology. Here we review some of the literature about T cell responses during *T. cruzi* infection and study the contribution of T cells generated during *T. cruzi* infection to cardiac pathology focused, in particular, in T cells specific for the C-terminal repeats of the *T. cruzi* shed acute phase antigen (SAPA) cross-reactive with the Cha autoantigen.

## AUTOIMMUNITY AND *T. CRUZI* INFECTION

The finding of a T cell rich inflammatory mononuclear cell infiltrate and the scarcity of parasites in heart lesions<sup>27,28</sup> questioned the direct participation of

*T. cruzi* in Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) and suggested the possible involvement of autoimmunity.<sup>24,29–36</sup> Autoimmune responses can be induced through molecular mimicry, a mechanism by which infectious agents may trigger an antigen-specific B and/or T cell-specific immune response against self. In addition, cytokine mediated bystander activation may directly stimulate surrounding cytotoxic T cells in the absence of direct triggering of the T cell receptor. Both mechanisms may contribute to tissue damage. Studies about autoimmunity in Chagas disease were reported many years ago,<sup>37–44</sup> and they are supported by a large body of circumstantial evidence thereafter and had been extensively and sequentially reviewed.<sup>24,30,31,33,45,46</sup>

On the other hand, recent evidence is challenging this view. Thus, with the use of more sensitive techniques, parasite antigens or DNA are detected during the chronic phase. This has led to the suggestion that damage is more likely caused either by an inflammatory response against the parasite or to the parasite replication itself than by autoimmunity.<sup>29,32,47</sup> However, it should be emphasized that to date there is no unequivocal demonstration that either autoimmunity or parasite-specific immunity is the actual cause of pathogenesis.

To consider that an infectious disease has an autoimmune etiology the following postulates have to be demonstrated: (1) association of the disease with a particular microorganism; (2) identification of the culprit microorganism epitope(s) that elicits the cross-reactive response; (3) T cell or B-cell populations against that epitope(s) should be expanded in the infection; (4) elimination of the cross-reactive epitope(s) from the microorganism should result in non-pathogenic infection; (5) autoreactive T cells should be able to transfer the disease.<sup>48</sup> According to the literature, in Chagas disease, postulates 1–3 have been described, the 4th is very difficult to demonstrate due to high gene copy number for many *T. cruzi* genes and several putative epitopes, and the 5th is still debated.

## MOLECULAR MIMICRY

In *T. cruzi* infection many examples of molecular mimicry at the level of antibodies have been described.<sup>49</sup> Thus, anti-*T. cruzi* circulating antibodies that cross-react with host heart and neural cells is a common finding in chagasic humans and animal models of infection,<sup>24,33,35</sup> but with few exceptions none of the autoantibodies seem to be the leading cause of autoimmune pathogenesis. However, descriptions are scarce of cross-reactive T cells in this infection (TABLE 1). Mainly, cross-reactive T cell epitopes had been studied for a given antigen after the B-cell epitope was identified. Parasite and self-peptide antigen epitopes recognized by antibodies during *T. cruzi* infection had been identified by different methods (affinity chromatography, peptide sequencing, cDNA library immunoscreening). Contrarily, for T cell epitopes there is no systematic assay to identify them, so very few have been described.

**TABLE 1. T cell reactivity against host antigens: defined cross-reactive epitopes**

	Cross-reactive antigens	Species	Molecular definition	Cross-reactive epitopes	Reference
Host	Cardiac myosin heavy chain	Human	T cells	AAALDK ::: ::	(72,73)
<i>T. cruzi</i>	B13			AAAGDK	
Host	Cha	Mouse	T cells	SLVTCPAQGSLQSSPSMEI : . : : : : : : .	(68)
<i>T. cruzi</i>	Shed acute phase antigen (SAPA)			STPSTPADSSAHSTPSTPV	
Host	Cardiac myosin heavy chain	Mouse	DTH		(66,67)

Studies of immunodominant T cell responses during infection would be very useful in vaccine design and also to avoid secondary effects as potentially pathogenic epitopes. This observation can be made extensive to other infectious diseases.

**AUTOREACTIVE T CELLS**

A great effort has been made in characterizing the nature of the inflammatory infiltrate in chronic and acute phases of *T. cruzi* infection both in humans and mouse,<sup>50-57</sup> but there are only a few reports addressing the role of T cells in the generation of pathology (TABLE 1).<sup>49</sup> Evidence supporting the role for autoantigen-specific autoimmunity in disease pathogenesis derives from studies on T cell-mediated immunity in mice. Ribeiro-Dos-Santos *et al.* have described that CD4<sup>+</sup> T cell line obtained from a chronic chagasic mouse proliferated in response to either a crude *T. cruzi* Ag preparation or heart tissue extracts from different animal species.<sup>58</sup> In culture, this cell line arrests the beating of fetal heart cells, and more importantly, induces myocarditis in immunized mice and promotes rejection of transplanted normal hearts in the absence of *T. cruzi*.<sup>58</sup> The requirement of the parasite to cause this rejection in mice transferred with T cells from infected mice has also been widely debated.<sup>58-61</sup> Thus, there are opposite results indicating that rejection of syngeneic-transplanted hearts in chronically infected mice takes place in the presence<sup>60</sup> or in the absence<sup>61</sup> of the parasite.

Cunha-Neto *et al.* have also proposed that myosin cross-reactive T lymphocytes infiltrating heart tissue lesions are involved in the generation of chronic chagasic pathology.<sup>59,62</sup> These T cells are activated by cardiac myosin heavy chain cross-reactive *T. cruzi* antigen (Ag; TABLE 1).<sup>49,62</sup> Moreover, T cells from chagasic patients with overt heart disease or asymptomatic patients responded to *in vitro* stimulation with B13 with increased interferon (IFN)- $\gamma$

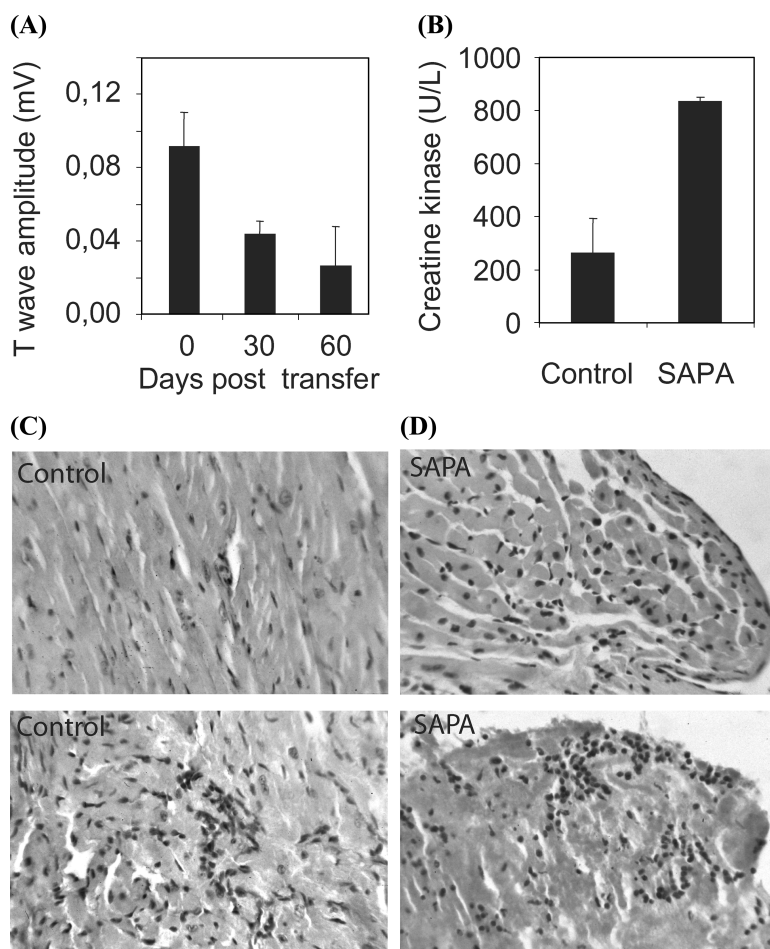
and reduced interleukin (IL)-4 production suggesting a type 1 helper T cells (Th1)-type cytokine profile.<sup>63,64</sup> Those authors proposed that heart damage in CCC could be due to a delayed-type hypersensitivity (DTH) process initiated by B13 inducing the release of inflammatory cytokines.

Noteworthy, immunological tolerance to heart Ag prior to their infection by *T. cruzi* resulted in less intense cardiomyopathy than control nontolerized animals,<sup>65</sup> which would be in favor of the autoimmune pathology hypothesis. This treatment only affects CD4<sup>+</sup> responses and not the production of anti-myosin IgG discarding B-cell autoreactivity as the cause of pathology. Although this suggests that the regime to make the mice tolerant was not as effective as expected, at least regarding the humoral response (Th2 mediated), it supports that the response involved in heart damage is Th1 mediated. Leon *et al.* have described in the acute phase that myosin autoimmunity, while potentially important inflammatory mechanism in acute and chronic infection, is not essential for cardiac inflammation,<sup>66</sup> although immunization with a *T. cruzi* extract induced a DTH response against myosin.<sup>67</sup>

The Cha autoantigen was isolated by immunoscreening of a human Jurkat cDNA expression library using a pool of sera from chagasic patients, and is expressed also in mice with a high percentage of homology. In addition, Cha presented high homology with *T. cruzi* antigens (SAPA and Tenu 2845/36 kDa antigen), being recognized by high percentage of human and mouse chagasic sera.<sup>68</sup> When tested in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Cha showed high specificity and sensitivity in the diagnosis of chagasic sera.<sup>69</sup> The SAPA antigen is involved in evasion of the immune system and the C-terminal repeats behaved as a strong T cell epitope during experimental infection. It belongs to the transalidase family, the most abundantly represented in the *T. cruzi* genome.<sup>70</sup> Moreover, it is characterized for presenting several copies of each gene. In particular the cross-reactive epitope is present in several repeats in the C-terminal of SAPA and other members of the family as Neuraminidase. For this reason, the demonstration of the 5th autoimmune postulate is unaffordable, because engineering a parasite devoid of this sequence is not possible. On the other hand, the high representation of SAPA cross-reactive repeats and the immunodominant response observed during infection are in agreement with a possible pathogenic role of autoreactive T cells.

## ADOPTIVE TRANSFER OF T CELLS AND AUTOIMMUNITY

Transfer of T cells from chronically infected mice to naive syngeneic mice lead to heart infiltration, detectable 60 days later.<sup>68</sup> These experiments were criticized thereafter for the lack of proper controls as purity of the transferred cells and for the detection of putative residual parasites present in the purified T cells.<sup>29,36,49,71</sup> We should emphasize that fluorescent staining with anti-CD4 antibody showed that 99% of the transferred cells were positive for this



**FIGURE 1.** Cardiac pathology observed after adoptive transfer of SAPA-specific cross-reactive T cells in recipient mice. The following parameters indicative of cardiac damage were observed: **(A)** a gradual decrease in electrocardiographic T wave amplitude was observed at 30 and 60 days after adoptive transfer of SAPA-specific cross-reactive T cells in comparison with T wave amplitude prior to transfer; **(B)** an increased creatine kinase activity in serum of SAPA-transferred mice respect to control mice; **(C, D)** an inflammatory infiltrate was observed in H&E stains of myocardial and endocardial tissue, respectively, in mice transferred with SAPA-specific cross-reactive T cells in comparison with control mice.

T cell marker, and recipient mice were devoid of *T. cruzi* evaluated by sensitive polymerase chain reaction (PCR). No parasite DNA was detected in blood at 10, 20, and 60 days, and neither in cardiac tissue at 60 days post-transfer, suggesting that T cell purification got rid of any residual parasite (unpublished

results). To study in more detail the possible pathogenic role of a specific cross-reactive T cell epitope as SAPA, we performed adoptive transfer experiments of a CD4<sup>+</sup> T cell clone generated from spleen cells of mice immunized with the SAPA cross-reactive peptide. We recorded temperature, activity, heart beat, and electrocardiographic data, by telemetry in conscious mice before transfer and 30 and 60 days post-transfer. Mice in control and SAPA groups presented normal basal temperature values, conscious activity, and heart beat rate (data not shown). Interestingly, electrocardiogram results showed a significant alteration in heart function measured as T wave amplitude or repolarization at 30 and 60 days post-transfer, being more severe at 60 days post-transfer (FIG. 1A). This alteration is characteristic of inflamed and edematous hearts and is known as unspecific alterations in heart repolarization. In addition, cardiac damage measured by creatine kinase activity in serum was increased at 60 days post-transfer (FIG. 1B). The hematoxylin and eosin (H&E) stain of heart tissue showed that different structures, such as myocardium and endocardium, presented inflammatory infiltrate in mice transferred with SAPA CD4<sup>+</sup>-specific T cells in comparison with recipient mice transferred with control CD4<sup>+</sup> cells (FIG. 1C, D, respectively). These results may explain the unspecific repolarization alterations previously observed.

Future experiments will focus on determining the immune mechanism(s) responsible for the pathology observed after *T. cruzi*-specific T cell adoptive transfer.

## CONCLUSIONS

A systematic study of the specificity of the T cell response during *T. cruzi* infection is not possible to date. However, the study of the known antigens that produce strong T cell cross-reactive responses can give some hints for vaccine design. Our results showed that T cells purified from chronically infected mice and T cells specific for the SAPA cross-reactive antigen were able to induce alterations in heart repolarization, cardiac inflammation, and tissue damage in recipient mice. This indicates that an autoimmune component exists that should be considered for future preventive and therapeutical strategies.

## ACKNOWLEDGMENTS

The experimental work of the authors mentioned in this manuscript has been supported by grants and fellowships from "Ministerio de Ciencia y Tecnología," "Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (RICET)," "Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)," FIS project PI060388, "Comunidad Autónoma de Madrid (CAM)," and "Fundación Ramón Areces." C.S was financed by the Universidad Central de Venezuela.

## REFERENCES

1. CHAGAS, C. 1909. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schitrypanum cruzi* n. gen., n. sp. Agente etiolojico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. **1**: 159–219.
2. TANOWITZ, H.B. *et al.* 1992. Chagas' disease. Clin. Microbiol. Rev. **5**: 400–419.
3. PRATA, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect. Dis. **1**: 92–100.
4. MONCAYO, A. 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. **94**(Suppl. 1): 401–404.
5. BURLEIGH, B.A. & N.W. ANDREWS. 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Curr. Opin. Microbiol. **1**: 461–465.
6. KIRCHHOFF, L.V. 1989. Is *Trypanosoma cruzi* a new threat to our blood supply? Ann. Intern. Med. **111**: 773–775.
7. WENDEL, S. 1998. Transfusion-transmitted Chagas' disease. Curr. Opin. Hematol. **5**: 406–411.
8. GIRONES, N. *et al.* 2006. The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. Vox Sang. **91**: 285–291.
9. KIRCHHOFF, L.V. 1993. Chagas disease. American trypanosomiasis. Infect. Dis. Clin. North Am. **7**: 487–502.
10. DIAS, E. *et al.* 1956. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation **14**: 1035–1060.
11. PRATA, A. 1994. Chagas' disease. Infect. Dis. Clin. North Am. **8**: 61–76.
12. ALTCHER, J. *et al.* 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **38**(Suppl. 2): 41–45.
13. SUAREZ, E. *et al.* 2005. Integral treatment of congenital Chagas disease: the Bolivian experience. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **38**(Suppl. 2): 21–23.
14. DOS SANTOS, C.D., M.P. TOLDO & J.C. DO PRADO, JR. 2005. *Trypanosoma cruzi*: the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. Acta Trop. **95**: 109–115.
15. LO PRESTI, M.S. *et al.* 2004. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Int. J. Antimicrob. Agents **23**: 634–636.
16. MEIRA, W.S. *et al.* 2004. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. J. Clin. Microbiol. **42**: 707–712.
17. NAKAYAMA, H. *et al.* 2001. Experimental treatment of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice with 2-n-propylquinoline. Phytother. Res. **15**: 630–632.
18. SILVA, D.T. *et al.* 2006. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. Int. J. Antimicrob. Agents **27**: 530–537.
19. FUJIMURA, A.E. *et al.* 2001. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect. Immun. **69**: 5477–5486.
20. MACHADO, A.V. *et al.* 2006. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Hum. Gene Ther. **17**: 898–908.

21. MIYAHIRA, Y. *et al.* 2005. Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* **73**: 7356–7365.
22. MORELL, M. *et al.* 2006. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* **24**: 7046–7055.
23. VASCONCELOS, J.R. *et al.* 2004. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* **15**: 878–886.
24. ENGMAN, D.M. & J.S. LEON. 2002. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.* **81**: 123–132.
25. GIRONES, N., H. CUERVO & M. FRESNO. 2005. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **296**: 89–123.
26. GIRONES, N. & M. FRESNO. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.* **19**: 19–22.
27. ANDRADE, Z.A. & S.G. ANDRADE. 1955. The pathology of Chagas' disease (cardiac chronic form). *Bol. Fund G Moniz.* **6**: 1–53.
28. MAZZA, S. 1949. La enfermedad de Chagas en la Rep. Argentina. *Mem Inst. Oswaldo. Cruz.* **47**: 273–288.
29. TARLETON, R.L. 2003. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol.* **19**: 447–451.
30. KIERSZENBAUM, F. 1986. Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.* **72**: 201–211.
31. SOARES, M.B., L. PONTES-DE-CARVALHO & R. RIBEIRO-DOS-SANTOS. 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* **73**: 547–559.
32. TARLETON, R.L. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* **31**: 550–554.
33. KIERSZENBAUM, F. 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 210–223.
34. LEVIN, M.J. 1996. In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. *Parasitol. Today* **12**: 415–416.
35. KIERSZENBAUM, F. 2003. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**: 1–11.
36. HYLAND, K.V. & D.M. ENGMAN. 2006. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol.* **22**: 101–102; author reply 103.
37. ACOSTA, A.M. & C.A. SANTOS-BUCH. 1985. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* **71**: 1255–1261.
38. MCCORMICK, T.S. & E.C. ROWLAND. 1989. *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp. Parasitol.* **69**: 393–401.
39. TAKLE, G.B. & L. HUDSON. 1989. Autoimmunity and Chagas' disease. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **145**: 79–92.
40. COSSIO, P.M. *et al.* 1974. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* **49**: 13–21.
41. COSSIO, P.M. *et al.* 1974. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* **50**: 1252–1259.



42. SANTOS-BUCH, C.A. & A.R. TEIXEIRA. 1974. The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. J. Exp. Med. **140**: 38–53.
43. WOOD, J.N. *et al.* 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and *Trypanosoma cruzi* parasites. Nature **296**: 34–38.
44. COSSIO, P.M. *et al.* 1984. Experimental myocarditis induced in Swiss mice by homologous heart immunization resembles chronic experimental Chagas' heart disease. Clin. Immunol. Immunopathol. **33**: 165–175.
45. EISEN, H. & S. KAHN. 1991. Mimicry in *Trypanosoma cruzi*: fantasy and reality. Curr. Opin. Immunol. **3**: 507–510.
46. LEON, J.S. & D.M. ENGMAN. 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. Int. J. Parasitol. **31**: 555–561.
47. TARLETON, R.L. & L. ZHANG. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? Parasitol. Today **15**: 94–99.
48. BENOIST, C. & D. MATHIS. 2001. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? Nat. Immunol. **2**: 797–801.
49. CUNHA-NETO, E. *et al.* 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity **39**: 41–54.
50. PADILLA, A. *et al.* 2007. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. Infect. Immun. **75**: 231–235.
51. ALBAREDA, M.C. *et al.* 2006. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. Int. Immunol. **18**: 465–471.
52. MARTIN, D.L. *et al.* 2006. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. PLoS Pathog. **2**: e77.
53. KOTNER, J. & R. TARLETON. 2006. Endogenous CD4+CD25+ regulatory T cells have limited role in control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infect. Immun. **75**: 861–869.
54. MARTIN, D.L. & R.L. TARLETON. 2005. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. **174**: 1594–1601.
55. MARTIN, D. & R. TARLETON. 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol. Rev. **201**: 304–317.
56. LAUCELLA, S.A. *et al.* 2004. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. J. Infect. Dis. **189**: 909–918.
57. LEAVEY, J.K. & R.L. TARLETON. 2003. Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. **170**: 2264–2268.
58. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *et al.* 2001. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. **23**: 93–101.
59. CUNHA-NETO, E. *et al.* 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 3541–3545.
60. TARLETON, R.L., L. ZHANG & M.O. DOWNS. 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 3932–3937.

61. RIBEIRO DOS SANTOS, R. *et al.* 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **175**: 29–39.
62. CUNHA-NETO, E. *et al.* 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest.* **98**: 1709–1712.
63. ABEL, L.C., J. KALIL & E. CUNHA NETO. 1997. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**: 1305–1308.
64. ABEL, L.C. *et al.* 2001. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.* **17**: 99–107.
65. PONTES-DE-CARVALHO, L. *et al.* 2002. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *J. Autoimmun.* **18**: 131–138.
66. LEON, J.S., K. WANG & D.M. ENGMAN. 2003. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. *J. Immunol.* **171**: 4271–4277.
67. LEON, J.S. *et al.* 2001. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infect. Immun.* **69**: 5643–5649.
68. GIRONES, N. *et al.* 2001. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J. Clin. Invest.* **107**: 985–993.
69. GIRONES, N. *et al.* 2001. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 1039–1043.
70. EL-SAYED, N.M. *et al.* 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**: 409–415.
71. KIERSZENBAUM, F. 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol.* **21**: 513–516.
72. ABEL, L.C. *et al.* 2005. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect.* **7**: 1184–1195.
73. IWAI, L.K. *et al.* 2005. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J. Autoimmun.* **24**: 111–117.

# Amiodarone Has Intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity and Acts Synergistically with Posaconazole†

Gustavo Benaim,<sup>1,◇</sup> John M. Sanders,<sup>11</sup> Yael Garcia-Marchán,<sup>◇</sup> Claudia Colina,<sup>‡</sup> Renee Lira,<sup>§</sup> Aura R. Caldera,<sup>§</sup> Gilberto Payares,<sup>◇</sup> Cristina Sanoja,<sup>◇</sup> Juan Miguel Burgos,<sup>#</sup> Annette Leon-Rossell,<sup>▽</sup> Juan Luis Concepcion,<sup>⊗</sup> Alejandro G. Schijman,<sup>#</sup> Mariano Levin,<sup>#,□</sup> Eric Oldfield,<sup>11,▽</sup> and Julio A. Urbina<sup>§,\*</sup>

Laboratorio Química Biológica and Laboratorio de Permeabilidad Iónica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21927, Caracas 1020A, Venezuela, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, Lab. Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina, Institut Cochin, Department Maladies Infectieuses, INSERM U567, Paris F-75014, France, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, 600 South Mathews Avenue, Urbana, Illinois 61801, Department of Biophysics, University of Illinois at Urbana-Champaign, 607 South Mathews Avenue, Urbana, Illinois 61801, and Departamento de Biología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

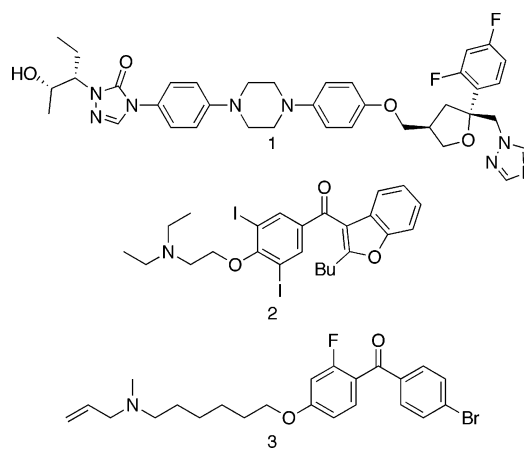
Received July 20, 2005

There is no effective treatment for the prevalent chronic form of Chagas' disease in Latin America. Its causative agent, the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, has an essential requirement for ergosterol, and ergosterol biosynthesis inhibitors, such as the antifungal drug posaconazole, have potent trypanocidal activity. The antiarrhythmic compound amiodarone, frequently prescribed for the symptomatic treatment of Chagas' disease patients, has also recently been shown to have antifungal activity. We now show here for the first time that amiodarone has direct activity against *T. cruzi*, both in vitro and in vivo, and that it acts synergistically with posaconazole. We found that amiodarone, in addition to disrupting the parasites' Ca<sup>2+</sup> homeostasis, also blocks ergosterol biosynthesis, and that posaconazole also affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis. These results provide logical explanations for the synergistic activity of amiodarone with azoles against *T. cruzi* and open up the possibility of novel, combination therapy approaches to the treatment of Chagas' disease using currently approved drugs.

## Introduction

Chagas' disease remains the largest parasitic disease burden in Latin America, despite recent advances in the control of the transmission of the disease in some parts of the continent.<sup>1</sup> After the initial acute phase, which has a low (<10%) mortality and is often asymptomatic, a chronic condition establishes that can lead in 30–40% of cases to severe lesions of internal organs including Chagas' disease cardiomyopathy, which may result in cardiac arrhythmias, ventricular aneurysm, congestive heart failure, thromboembolism, and sudden death.<sup>2</sup> Specific treatments for this disease remain unsatisfactory due to limited efficacy, particularly in the prevalent chronic stage, and frequent deleterious side effects.<sup>3</sup> There is considerable interest in the development of new drugs for the treatment of Chagas' disease,<sup>3</sup> and in recent work it has been shown that compounds such as the sterol C14 $\alpha$  demethylase inhibitor posaconazole ((2)-4-[4-[4-[[(2*R*,*cis*)-5-(2,4-difluorophenyl)-tetrahydro-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)furan-3-yl]methoxy]phenyl]-2,4-dihydro-2-[(*S*)-1-ethyl-2(*S*)-hydroxypropyl]-3*H*-1,2,4-triazol-3-one, **1**, Chart 1) can provide high percentages of parasitological cures

Chart 1



in several animal models of acute and chronic Chagas' disease.<sup>3–6</sup> This compound, like many other azoles, blocks the biosynthesis of ergosterol, which is essential for parasite survival.<sup>3</sup>

There is, however, always interest in improving the efficacy of a given drug (and decreasing the likelihood of resistance) by using combination therapies. The K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channel antagonist amiodarone (2-butyl-3-benzofuran-4-[2-(diethyl-amino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl ketone, **2**, Chart 1) is the drug most frequently used to treat arrhythmias in chronic stage Chagas' disease patients with cardiac involvement.<sup>2,7</sup> In recent work, it has been shown that this compound has broad-spectrum antifungal activity,<sup>8</sup> mediated at least in part by disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis,<sup>9,10</sup> in addition to acting synergistically with the azole ergosterol biosynthesis inhibitors.<sup>10,11</sup> These results

† This article is dedicated to Dr. Harry Aquatella.

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: 58-212-5041660, Fax: 58-212-5041093, e-mail: jaurbina@ivic.ve.

§ Laboratorio Química Biológica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

‡ Laboratorio de Permeabilidad Iónica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

<sup>1</sup> Instituto de Estudios Avanzados.

<sup>◇</sup> Universidad Central de Venezuela.

<sup>#</sup> INGEBI-CONICET.

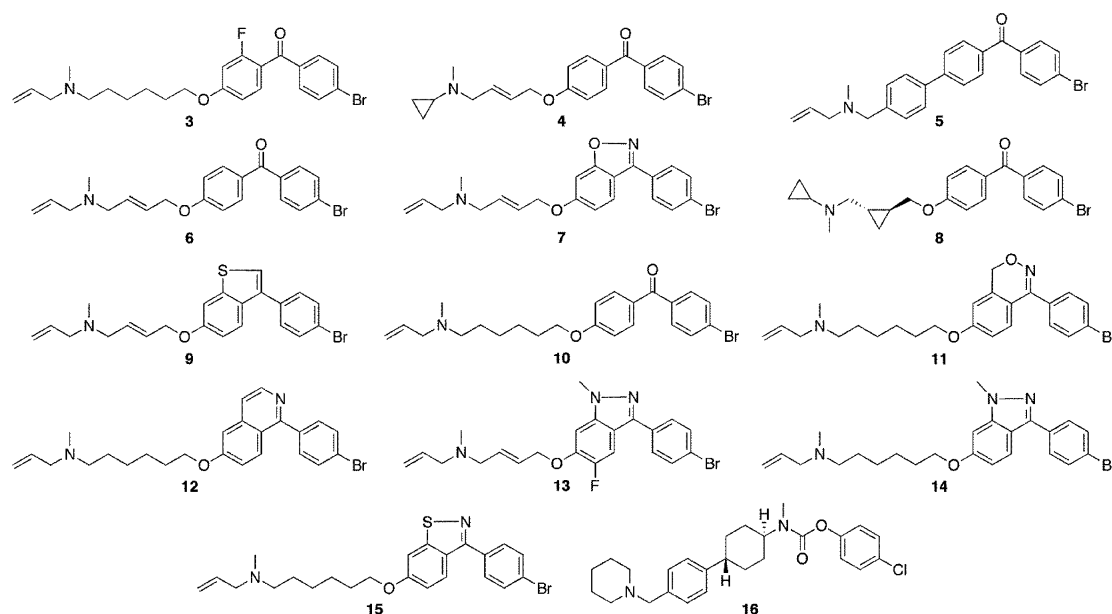
<sup>□</sup> Institut Cochin.

<sup>11</sup> Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign.

<sup>▽</sup> Department of Biophysics, University of Illinois at Urbana-Champaign.

<sup>⊗</sup> Universidad de Los Andes.

Chart 2



suggested the desirability of testing amiodarone against *T. cruzi*, alone and in combination with posaconazole.

## Materials and Methods

**Parasites.** The EP stock of *T. cruzi* (a virulent strain isolated from a pediatric case in Carabobo State, Venezuela) was used in this study.<sup>12</sup> Handling of live *T. cruzi* was done according to established guidelines.<sup>13</sup>

**Studies of in Vitro Antiproliferative Activity.** The epimastigote form of the parasite was cultivated in liver infusion tryptose medium,<sup>12</sup> supplemented with 10% new born calf serum (Gibco) at 28 °C with strong (120 rpm) agitation. Cultures were initiated at a cell density of  $2 \times 10^6$  epimastigotes mL<sup>-1</sup>, and drugs were added at a cell density of  $0.5\text{--}1.0 \times 10^7$  epimastigotes mL<sup>-1</sup>. Cell densities were measured by using an electronic particle counter (model ZBI; Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL) as well as by direct counting with a hemocytometer. Cell viability was followed by Trypan blue exclusion, using light microscopy. Amastigotes were cultured in Vero cells maintained in minimal essential medium supplemented with 1% fetal calf serum in a humidified atmosphere (95% air–5% CO<sub>2</sub>) at 37 °C, as described previously.<sup>5,6</sup> Cells were infected with 10 tissue culture-derived trypomastigotes per cell for 2 h and then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove nonadherent parasites. Fresh medium with and without drugs was added, and the cells were incubated for 96 h with a medium change at 48 h. The percent of infected cells and the numbers of parasites per cell were determined directly using light microscopy, and a statistical analysis of the results was carried out as described previously.<sup>5,6</sup> IC<sub>50</sub> values were calculated by nonlinear regression, using the program GraFit (Erithacus Software Ltd, Surrey, UK). Fractional inhibitory concentrations (FIC) were calculated as described by Hallander et al.<sup>14</sup> Cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentrations in control and drug-treated extracellular epimastigotes were determined by fluorimetric methods, using Fura-2, again as described previously.<sup>15</sup> Subcellular Ca<sup>2+</sup> levels and mitochondrial membrane potentials were monitored on individual Vero cells infected with *T. cruzi* amastigotes by using time-scan confocal microscopy, as described in detail elsewhere.<sup>16,17</sup> Briefly, Vero cells heavily infected (72 h) with *T. cruzi* amastigotes were plated onto 22 × 40 mm glass coverslips (0.15 mm thickness) and incubated simultaneously with 10 μM cell-permeant Rhod-2 and 10 μg/mL Rhodamine-123 for 50 min at 37 °C in culture medium and then washed and incubated with Ringer's solution, with or without amiodarone. Under the conditions used,<sup>17</sup> fluorescence of Rhod-2 comes mainly from intracellular Ca<sup>2+</sup>-rich compartments, like

mitochondria, since its low affinity for Ca<sup>2+</sup> limits its fluorescence in the Ca<sup>2+</sup>-poor cytoplasm of the Vero cells or amastigotes. Rhodamine-123 is a mitochondrion-specific cationic dye, which distributes across the inner mitochondrial membranes strictly according to their membrane potential.<sup>18</sup>

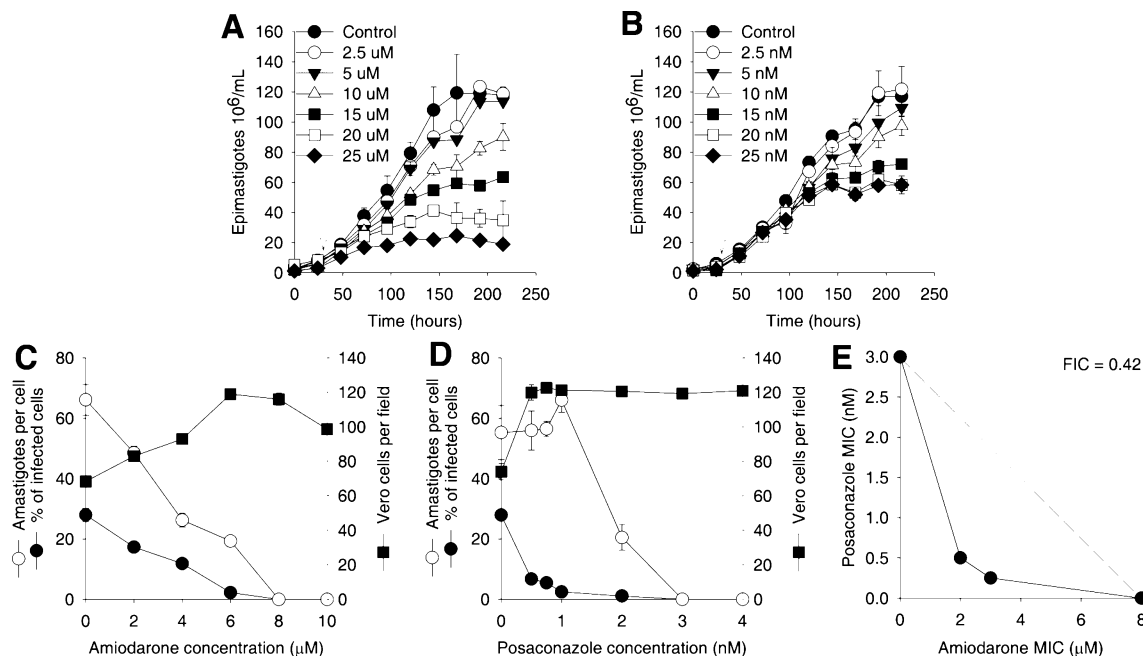
**Lipid Composition.** Lipid analyses were carried out as described in the Supporting Information.

**Enzymatic Assays.** Native squalene synthase was isolated and purified from *T. cruzi* epimastigotes and assayed by a radiometric spot-wash assay as described before,<sup>19</sup> while pure recombinant farnesyl diphosphate synthase was assayed as described by Montalvetti et al.<sup>20</sup>

**In Vivo Studies.** In vivo studies were carried out by using the murine model of acute Chagas' disease described previously,<sup>5,6</sup> in which female NMRI–IVIC mice (20–25 g) were infected with 10<sup>5</sup> or 10<sup>3</sup> bloodstream trypomastigotes and drug treatment was started 24 h later. Treatments were given for 30 consecutive days at 20 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> for posaconazole (30 doses) and/or at 50 mg kg<sup>-1</sup> every other day (eod) for amiodarone (15 doses). Negative controls (i.e. untreated animals) received only the vehicle, while positive controls were treated with the anti-*T. cruzi* compound, nifurtimox, at 50 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> for 30 days. Survival was followed daily and parasitemia weekly, the latter by direct microscopic examination. Animals were observed for 60 days postinfection, after which time parasitological cures were evaluated by using a combination of hemoculture, xenodiagnosis, and blood PCR tests.<sup>5,6</sup> For PCR, primers TcZ1 (5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3') and TcZ2 (5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') were used to detect *T. cruzi* satellite DNA (TcZ DNA).<sup>21</sup>

**Drugs.** Posaconazole was provided by Dr. David Loebenberg (Schering Plough Research Institute, Kenilworth, NJ). Amiodarone hydrochloride was obtained from Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO).

**Theoretical Calculations.** A common feature pharmacophore model for human oxidosqualene cyclase was built by using the Catalyst 4.8 program (Accelrys, Inc., San Diego, CA). For the training set, we only considered compounds with activities within an order of magnitude of the most active compound reported previously (Chart 2).<sup>22</sup> Up to 255 best quality conformations were generated for each compound, with the exception of **3** (Ro48-8071) ([4'-(6-allylmethylaminoethoxy)-2'-fluorophenyl]-(4-bromophenyl)-methanone, Chart 1), for which we used the X-ray crystallographic coordinates taken from PDB file 1W6J.<sup>23</sup> To ensure that Catalyst would only generate pharmacophores that fit the X-ray crystallographic structure of **3** from the protein/ligand complex, the

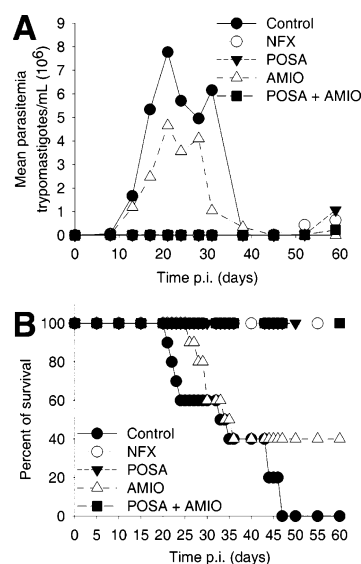


**Figure 1.** Antiproliferative activities of amiodarone and posaconazole against *Trypanosoma cruzi* in vitro. Effects of amiodarone (A) and posaconazole (B) on the growth of *T. cruzi* extracellular epimastigotes. Experiments were carried out in triplicate and each bar represents one standard deviation. Effects of amiodarone (C) and posaconazole (D) on the proliferation of *T. cruzi* amastigotes cultured inside Vero cells at 37 °C. Shown are the percentage of infected cells (●), the number of amastigotes per cell (■), and the number of Vero cells per field (■) after 96 h of incubation, as a function of drug concentration. Experiments were carried out in quadruplicate and each bar represents one standard deviation. (E) Isobologram illustrating the combined effects of amiodarone and posaconazole on *T. cruzi* intracellular amastigotes. The drug concentrations (alone or in combination) that led to the complete eradication of the intracellular parasites after 96 h are shown. The broken line corresponds to the predicted positions of the experimental points for simple additivity. A fractional inhibitory concentration (FIC) of 0.42 was calculated according to Hallander et al.<sup>14</sup>

ligand was assigned a principal value of two, whereas all other compounds were assigned principal values of one. By assigning only **3** a principal value of two, only the X-ray structure of **3** can influence the geometries of pharmacophores output by the program; the other training set compounds are merely required to adopt a geometry consistent with the output pharmacophores. This provides structural information, such that the mapped conformations of a given inhibitor might better approximate the actual conformations in the enzyme. Additional details are provided in the Supporting Information. Autodock 3.05<sup>24</sup> was run with default parameters with the exceptions of *ga\_num\_evals*, which was set to 2 500 000 (default is 250 000), and *ga\_run*, which was set to 100 (default is 10). Docking and cross-docking experiments with 1W6J and 1W6K gave similar results. For more details, see the Supporting Information.

## Results and Discussion

We show in Figure 1 the effects of amiodarone and posaconazole on the proliferation of *T. cruzi* in vitro. Amiodarone (**2**) had a clear, dose-dependent effect on proliferation of the epimastigote (extracellular) stages, with a minimal inhibitory concentration of 20  $\mu\text{M}$  and an  $\text{IC}_{50}$  of 9  $\mu\text{M}$  (Figure 1A), while for posaconazole the corresponding values were 20 and 14 nM (Figure 1B). Against the clinically relevant intracellular amastigote form of the parasite, both drugs were even more potent. Amiodarone had minimal inhibitory concentration and  $\text{IC}_{50}$  values of 8 and 2.7  $\mu\text{M}$  (Figure 1C), while for posaconazole (**1**), the corresponding values were 3 and 0.25 nM (Figure 1D). These results indicate that amiodarone has activity against both proliferative stages of *T. cruzi* comparable to its in vitro antifungal activity.<sup>8,10,11</sup> To explore this similarity in more depth, we investigated the effects of amiodarone and posaconazole in combination against *T. cruzi*, since synergistic effects between amiodarone and various other azole drugs have been reported in several yeasts and fungi. We used a checkerboard technique



**Figure 2.** Activities of amiodarone (AMIO), posaconazole (POSA), and nifurtimox (NFX) in a murine model of acute Chagas' disease. NMRI-IVIC mice were inoculated with  $10^5$  bloodstream form trypomastigotes of the Y strain and treatment started 24 h later. All drugs were given orally for 30 consecutive days at the following doses: AMIO, 50  $\text{mg kg}^{-1}$  every other day (eod); POSA and NFX at 50  $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

and the method of Hallander et al.<sup>14</sup> and obtained a fractional inhibitory concentration value of 0.42 (Figure 1E), indicating strong synergism.

Next, we investigated if the anti-*T. cruzi* activity of amiodarone detected in vitro could also be observed in vivo. In a preliminary study, NMRI mice were infected with a relatively high inoculum ( $10^5$  trypomastigotes/mouse), which led to a fulminant acute infection as previously described,<sup>5,6</sup> oral drug



**Table 1.** Effects of Amiodarone and Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease.  $10^3$  Trypomastigotes Mouse<sup>-1</sup>, Y Strain, 86 days pi<sup>a</sup>

treatment conditions	survival	negative parasitological tests <sup>b</sup>
no treatment (control)	8/10	3/8
amiodarone, 50 mg kg <sup>-1</sup> , eod, 15 doses	6/10	0/6
posaconazole, 20 mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> , 30 doses	10/10	6/10
amiodarone, 50 mg kg <sup>-1</sup> , eod, 15 doses + posaconazole, 20 mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> , 30 doses	10/10	8/10
nifurtimox, 50 mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> , 30 doses	8/10	4/8

<sup>a</sup> Female NMRI-IVIC mice (20–25 g) were infected with  $10^3$  bloodstream trypomastigotes and drug treatment started 24 h later, at the doses and frequencies indicated. <sup>b</sup> Hemoculture, xenodiagnosis, and TcZ DNA PCR; see Materials and Methods.

**Table 2.** Effects of Amiodarone and Posaconazole on the Free Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Concentration of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes<sup>a</sup>

measurement conditions <sup>a</sup>	control	posaconazole <sup>b</sup>	posaconazole <sup>c</sup>
2 mM Ca <sup>2+</sup>	95 ± 35 (n = 15)	86 ± 27 (n = 8)	461 ± 64 (n = 9)
2 mM Ca <sup>2+</sup> + amiodarone <sup>d</sup>	174 ± 39 (n = 6)	193 ± 39 (n = 4)	668 ± 50 (n = 4)
0 mM Ca <sup>2+</sup>	99 ± 11 (n = 4)	97 ± 15 (n = 4)	480 ± 40 (n = 4)
0 mM Ca <sup>2+</sup> + amiodarone <sup>d</sup>	193 ± 26 (n = 4)	131 ± 11 (n = 4)	611 ± 77 (n = 4)

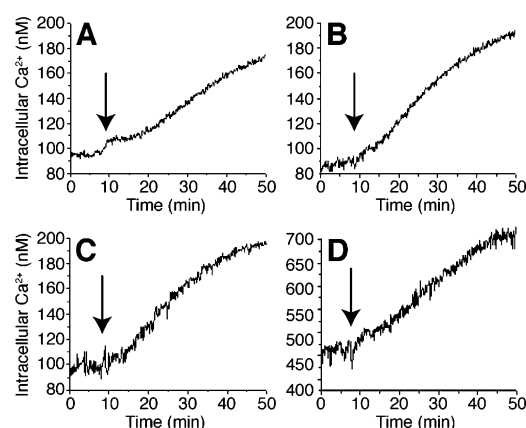
<sup>a</sup> Free cytoplasmic calcium concentrations were determined using fluorimetric methods with Fura-2, as described in previously.<sup>15</sup> Concentrations are expressed in nM. <sup>b</sup> Posaconazole treatment; 12.5 nM for 48 h. <sup>c</sup> Posaconazole treatment; 12.5 nM for 96 h. <sup>d</sup> Amiodarone concentration; 12.5 μM.

**Table 3.** Free Sterols Present in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes (EP stock) Grown in the Absence or Presence of Posaconazole, Amiodarone, or Their Combination<sup>a</sup>

sterol <sup>c</sup>	control	posaconazole <sup>a</sup>	amiodarone <sup>b</sup>	posaconazole <sup>a</sup> + amiodarone <sup>b</sup>
exogenous cholesterol	31.2	46.1	63.4	78.8
Endogenous, 14-Desmethyl:				
ergosterol	15.3	5.1	5.1	n.d. <sup>d</sup>
24-ethyl-5,7,22-cholestatrien-3β-ol	15.4	12.2	6.7	n.d.
ergosta-8,24(24')-dien-3β-ol	6.5	13.7	10.2	n.d.
ergosta-5,7-dien-3β-ol	9.5	3.6	4.1	n.d.
ergosta-5,7,24(24')-trien-3β-ol	8.5	n.d.	n.d.	n.d.
ergosta-7,24(24')-dien-3β-ol	7.6	3.2	3.0	n.d.
24-ethyl-5,7-cholesta-dien-3β-ol	6.0	7.5	7.5	n.d.
Endogenous, 14-Methyl:				
24-methylene-dihydrolanosterol	n.d.	3.2	n.d.	16.9
lanosterol	n.d.	5.5	n.d.	4.3

<sup>a</sup> Posaconazole concentration = 12.5 nM. <sup>b</sup> Amiodarone concentration = 12.5 μM. <sup>c</sup> Free sterols were isolated and purified from whole cells grown in the absence or presence of the indicated drug concentrations for 96 h; they were analyzed by high-resolution gas–liquid chromatography coupled with mass spectrometry, as described in Materials and Methods. <sup>d</sup> n.d., not detected.

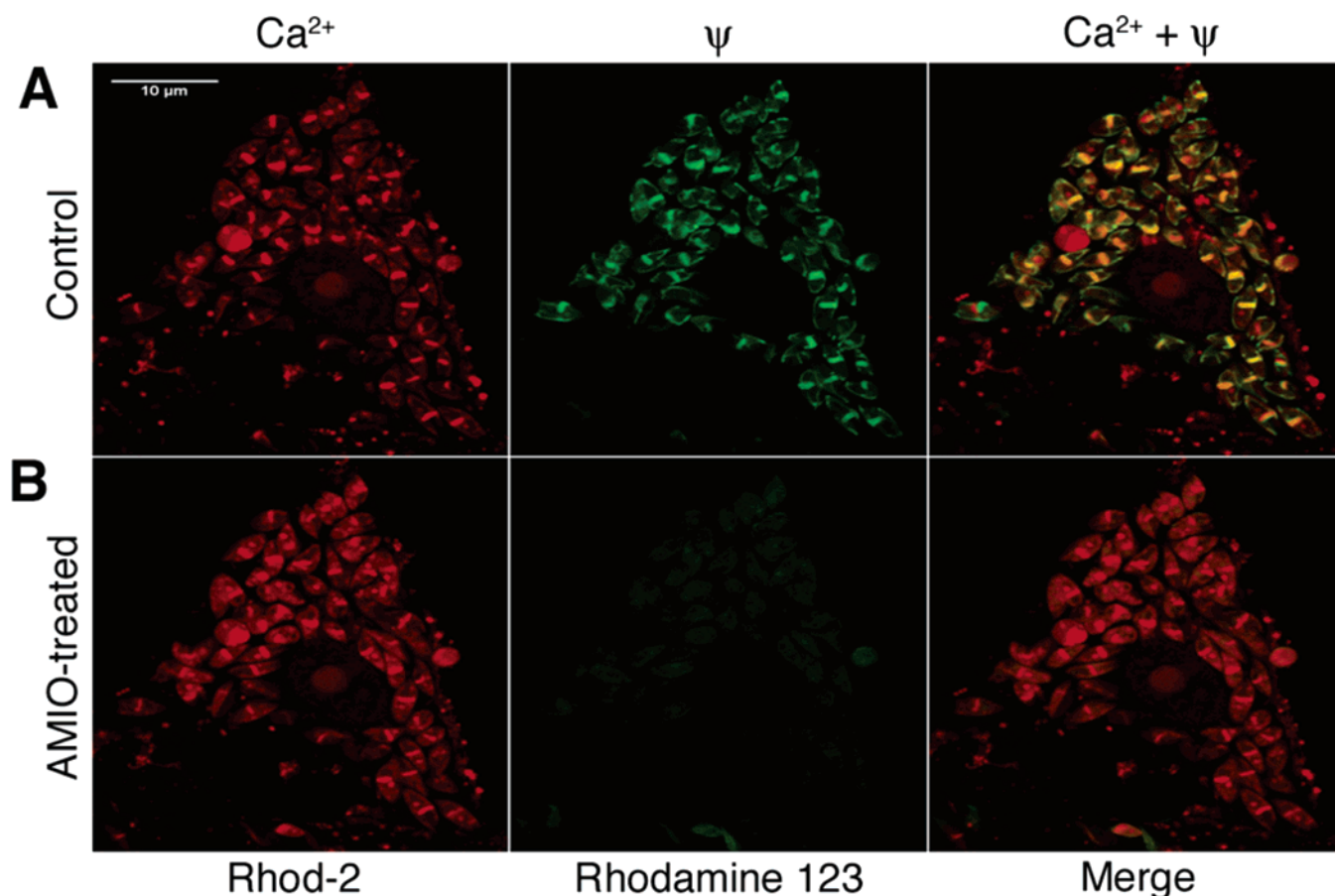
treatment was started 24 h post-inoculation (pi) and given for 30 days with amiodarone (50 mg kg<sup>-1</sup> every other day, eod), posaconazole (20 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), amiodarone plus posaconazole, nifurtimox (50 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), or no drug. As can be seen in Figure 2, treatment of infected animals with amiodarone alone reduced parasitemia (Figure 2A), increased survival 60 days pi (Figure 2B; 0% for untreated controls vs 40% for amiodarone-treated animals) and, when given in combination with posaconazole, delayed the development of parasitemia when compared with the all other treatment groups (Figure 2A). In a



**Figure 3.** Effects of amiodarone (AMIO) and posaconazole (POSA) on Ca<sup>2+</sup> homeostasis in *T. cruzi* epimastigotes. Epimastigotes, grown in the absence or presence of 12.5 nM POSA, were incubated in the presence of the cell permeant dye Fura-2 for 45 min. Cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentrations were determined fluorimetrically, as described elsewhere. (A) Effects of 12.5 μM AMIO on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in control (untreated) cells incubated with 2 mM external free Ca<sup>2+</sup>. (B) Effects of amiodarone (12.5 μM) on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in control (untreated) cells incubated in the presence of 1 mM external EGTA. (C) Effects of 12.5 μM AMIO on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in cells grown in the presence of 12.5 nM POSA for 48 h, incubated with 2 mM external free Ca<sup>2+</sup>. (D) Effects of 12.5 μM AMIO on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in cells grown in the presence of 12.5 nM POSA for 96 h, incubated with 2 mM external free Ca<sup>2+</sup>. Arrows indicate the time of addition of AMIO.

second model, mice were infected with a lower inoculum ( $10^3$  trypomastigotes/mouse) and treated with the same therapeutic schemes used for the first infection model. Survival and parasitological cures, 86 days pi, are presented in Table 1. Most (8/10) animals treated with the combination tested negative to hemoculture, xenodiagnosis, and blood PCR for nuclear satellite (TcZ) DNA, indicating very low parasite burdens (<50 trypomastigotes/mL<sup>21</sup>), versus 6/10 for those treated with posaconazole alone and 4/8 animals treated with the conventional treatment, nifurtimox. These results demonstrate that amiodarone has in vivo anti-*T. cruzi* activity and support further in vivo studies of this drug as an antiparasitic agent, used alone or in combination.

To probe the molecular basis of the antiparasitic activity of amiodarone and its synergism with posaconazole, we tested the effects of both drugs, alone and in combination, on the calcium homeostasis of both epimastigotes (Figure 3A–D, Table 2) and intracellular amastigotes (Figure 4A,B). Amiodarone at 12.5 μM induced a rapid increase in free cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> levels in epimastigotes (Figure 3A, Table 2), as determined by Fura-2 fluorescence.<sup>15</sup> The increase was due to drug-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular compartments, since the same effect was observed in the absence of external Ca<sup>2+</sup> (Figure 3B, Table 2). Cells exposed to 12.5 nM posaconazole for 48 h gave results similar to control cells (Figure 3C, Table 2), but cells exposed to posaconazole for 96 h had basal Ca<sup>2+</sup> cytoplasmic levels 4.5-fold higher than did control cells (Figure 3D, Table 2). Moreover, amiodarone was able to induce a further increase in these levels, which reached values 7-fold higher than those of the control cells (Figure 3D, Table 2). We were also able to detect selective effects of amiodarone on Ca<sup>2+</sup> homeostasis in intracellular *T. cruzi* amastigotes: Figure 4A,B show that when heavily infected Vero cells were exposed to amiodarone, there was a rapid release of Ca<sup>2+</sup> from the parasite's mitochondria, as detected by Rhod-2 fluorescence<sup>17</sup> (in red). There was also a collapse of the mitochondrial membrane potential, as dem-



**Figure 4.** Effects of amiodarone (AMIO) on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in *T. cruzi* amastigotes; Vero cells infected with *T. cruzi* were double-labeled with Rhod-2 (red) and Rhodamine 123 (green) to visualize mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and transmembrane electrical potentials, respectively. (A) Control cells, (B) cells treated with 12.5  $\mu\text{M}$  AMIO for 20 min. Note the drastic AMIO-induced reduction of the mitochondrial membrane potential and the corresponding increase in the parasites' free cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. These effects were not observed in the host cells.

onstrated by a decrease in Rhodamine 123 fluorescence<sup>18</sup> (in green), associated with the increase in the parasites'  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . However, no effects were seen on the host cells' free cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Such results contrast with those previously obtained in yeast, where it was shown that amiodarone disrupted  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis largely by inducing a rapid influx of this ion from the extracellular milieu, mediated by caffeine-sensitive MID-1 channels.<sup>9,10</sup> In any case, the results in Figures 3 and 4 and Table 2 clearly indicate that *both* amiodarone and posaconazole can disrupt  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in *T. cruzi*, a fact that could explain their antiproliferative synergism against *T. cruzi*. However, this may not be the only origin of the synergistic effects of these drugs, since it is possible that amiodarone also interferes with sterol biosynthesis, based on the fact that other  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blockers are known to inhibit sterol isomerases and yeast growth.<sup>25,26</sup>

We show in Table 3 the results of an experiment designed to test this possibility, in which we compared the sterols present in *T. cruzi* epimastigotes treated with amiodarone, posaconazole, or their combination, with those present in control (no drug treatment) cells. In cells treated with 12.5 nM posaconazole, we observed the expected<sup>5,27</sup> reduction of the parasite's endogenous 14-desmethyl sterols and a concomitant accumulation of 14-methyl sterols (lanosterol and eburicol), Table 3, Figure 5. However, in cells treated with 12.5  $\mu\text{M}$  amiodarone, there was also a significant reduction in the overall levels of endogenous sterols, but no accumulation of sterol intermediates, indicating inhibition of *de novo* sterol synthesis at a pre-lanosterol level (Table 3, Figure 5). When cells were treated

with the combination of amiodarone *plus* posaconazole, it was found that the (exogenous) cholesterol level increased to nearly 80% of total sterols, with no detectable levels of the parasite's normal 14-desmethyl sterols (Table 3). These findings clearly demonstrate that amiodarone has a previously unknown effect on sterol biosynthesis, providing a second logical basis for its synergism with posaconazole. Since no accumulation of squalene was observed, amiodarone does not target squalene epoxidase (Figure 5). There was some inhibitory activity on native *T. cruzi* squalene synthase (SQS),<sup>19</sup> albeit with low potency: the  $\text{IC}_{50}$  values were 12 and 8  $\mu\text{M}$  against microsomal and glycosomal SQS, respectively (data not shown). Likewise, there was no inhibition of a recombinant farnesyl diphosphate synthase<sup>20</sup> at 50  $\mu\text{M}$  amiodarone (data not shown). On the other hand, a TLC analysis of the neutral lipids from amiodarone-treated cells showed accumulation of a compound having an  $R_f$  value corresponding to that of squalene epoxide, indicating inhibition at the level of oxidosqualene cyclase (OSC, see Figure 5).

Structurally, amiodarone has considerable similarities to other known OSC inhibitors (including those known to inhibit *T. cruzi* growth<sup>28</sup>), as shown for example by comparison with the benchmark OSC inhibitor **3**. Both are halogenated bisaryl ketones with cationic oxymethylene side chains, and they have similar sizes. To investigate these similarities in more depth, we investigated the structural features key to OSC inhibition in a series of 14 potent OSC inhibitors<sup>22</sup> (Chart 2), using pharmacophore modeling with the Catalyst 4.8 program (Accelrys Inc., San Diego, CA).

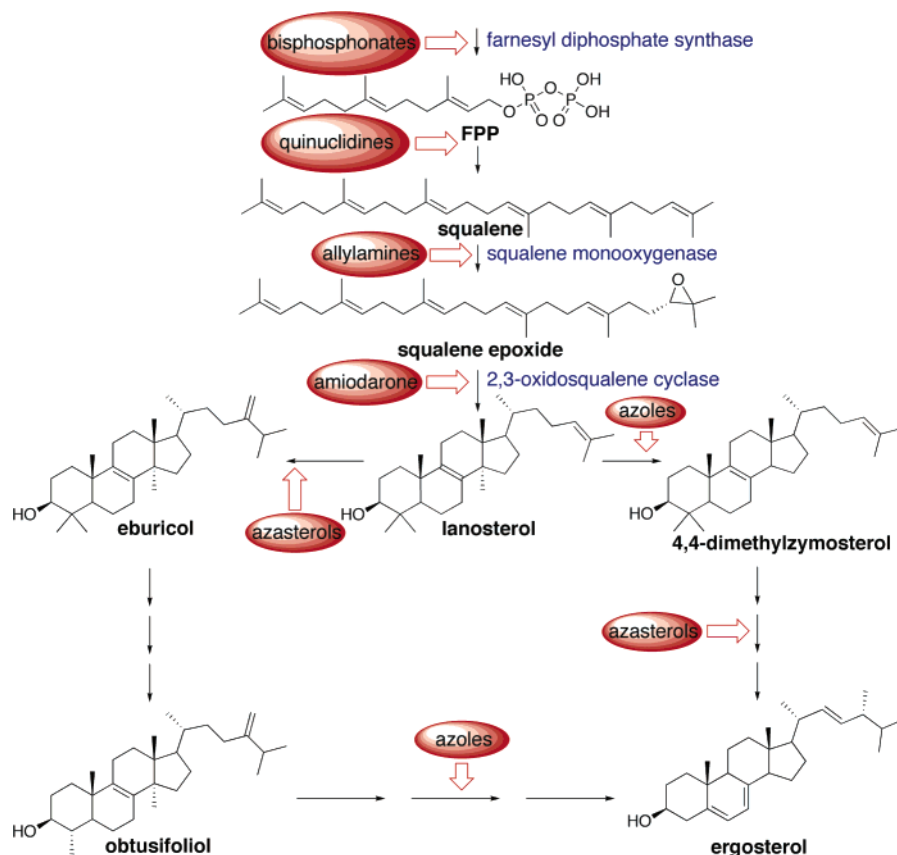


Figure 5. Sterol structures and sites of action of different inhibitors of ergosterol biosynthesis.

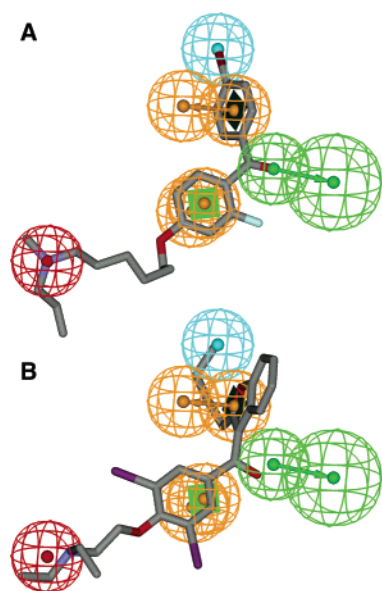


Figure 6. Pharmacophore model for oxidosqualene cyclase with (A) the X-ray crystallographic structure of **3** from 1W6J and (B) the best fit conformation of **2**. Pharmacophore features are: positive charge (red), aromatic ring (orange), hydrogen bond acceptor (green), and hydrophobic (cyan).

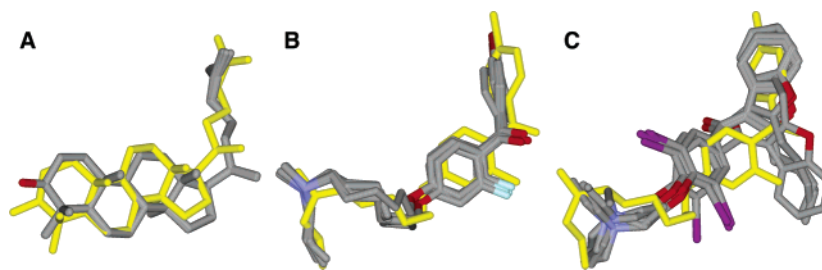
The results (Figure 6A) indicated the presence of five features common to the most active OSC inhibitors: a positive charge feature (red), two aromatic ring features (orange), a hydrogen bond acceptor feature (green), and a hydrophobic feature (cyan). These features are all present in amiodarone, although amiodarone does not fit the pharmacophore ideally (Figure 6B), which would result in activity lower than that of the most potent inhibitors. We also used the Autodock 3.05 program<sup>24</sup> to

determine whether amiodarone could fit into the sterol/inhibitor binding site in OSC. By way of controls, we first docked lanosterol and **3** into the active site of OSC (Figure 7A,B), where we found rms deviations of 0.98 Å and 0.97 Å from the crystallographic results, for lanosterol and Ro48-8071, respectively. Then, we docked amiodarone, obtaining the top five structures shown in Figure 7C, which are clearly similar to those found with **3**. Moreover, we found that many features of the pharmacophore model are associated with intermolecular interactions with the OSC protein, again providing support for amiodarone's effect on ergosterol biosynthesis. These facts indicate that amiodarone could represent a novel class of OSC inhibitor, a fact which may also help explain its antifungal activity.<sup>8</sup>

Of course, care needs to be exercised when considering combination therapy in humans. In this respect the US Federal Drug Administration has recently (March, 2004) added the following paragraph to the Cordarone (amiodarone HCl 200 mg tablets) label: 'Fluoroquinolones, macrolide antibiotics, and azoles are known to cause QTc prolongation. There have been reports of QTc prolongation, with or without TdP, in patients taking amiodarone when fluoroquinolones, macrolide antibiotics, or azoles were administered concomitantly, see WARNINGS, Worsened Arrhythmia'. However, studies in healthy volunteers have shown that posaconazole, in contrast with other azole derivatives, has no significant effects on the QTc interval,<sup>29,30</sup> a fact which could probably allow its concomitant administration with amiodarone. Nevertheless, caution should be used, as both compounds are substrates of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4).

**Conclusions.** The results described above are of interest for many reasons. First and foremost, we find that amiodarone, a drug currently in use for the symptomatic treatment of arrhythmias in many Chagas' disease patients, has an unexpected, direct





**Figure 7.** Molecular docking results based on oxidosqualene synthase structures (PDB files 1W6J and 1W6K). (A) Five top-scoring docked lanosterol structures together with its X-ray structure (in yellow); rms deviation = 0.98 Å. (B) Five top-scoring docked **3** structures together with its X-ray structure (in yellow); rms deviation = 0.97 Å. (C) Five top-scoring docked amiodarone structures together with the X-ray structure of **3** (in yellow).

anti-*T. cruzi* activity and that this activity is potentiated by the ergosterol biosynthesis inhibitor posaconazole. Amiodarone disrupts  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in *T. cruzi* by inducing the release of this ion from intracellular stores, specifically from the single giant mitochondrion present in those cells. This action is, however, parasite-specific, since it was not observed in the mammalian host cells, which grew normally under amiodarone levels that led to loss of parasite viability within 24 h. We also find that posaconazole affects  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and that amiodarone augments this effect. Disruption of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in posaconazole-treated *T. cruzi* epimastigotes and amastigotes is probably related to structural alterations of the parasite's mitochondrion that are observed in cells depleted of endogenous sterols upon prolonged exposure to ergosterol biosynthesis inhibitors.<sup>31,32</sup> In addition, we find that amiodarone blocks sterol biosynthesis in *T. cruzi*, and that posaconazole potentiates this effect as well. Thus, the combined effects of two mutually reinforcing molecular mechanisms, disruption of the parasite's  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and blockade of de novo ergosterol biosynthesis, could account for the antiproliferative and synergistic effects of the two drugs against this parasite. Moreover, we find that amiodarone has direct in vivo activity in murine models of Chagas' disease. Taken together, these results suggest that antiarrhythmia treatment of Chagas' disease patients with amiodarone could have the added benefit of reducing the patient's parasite load and enhancing the efficacy of specific antiparasitic agents.

Finally, the observation that amiodarone has direct broad-spectrum antifungal activity and that amiodarone/azole combinations are synergistic strongly suggests that similar growth inhibition mechanisms operate in yeasts and fungi, in addition to *T. cruzi*, and that further development of such combination therapies may be of broad general interest.

**Acknowledgment.** This work received financial support from the Howard Hughes Medical Institute (Grants 55000620 to J.A.U. and 55003682 to M.J.L.), the Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Fondo Nacional para la Ciencia y Tecnología, Venezuela (S1-1999000058 and G-2001000637, to G.B.), the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela (PI-03-10-4798-05, to G.B.), by the United States Public Health Service (GM-65307, to E.O.), by an award from the American Heart Association, Greater Midwest Affiliate (to J.M.S.), by a NIH Training Grant (GM-08276 to A.L.-R.), by the UNICEF/World Bank/UNDP/World Health Organization Program on Research and Training in Tropical Diseases (TDR, Grant A 20285 to A.S.) by the Fundación Bunge y Born (to A.S.) and the Fundación Nacional de Ciencia y Tecnología, Argentina (to M.J.L.). M.J.L. is International Professor of a Chaire Internationale de Recherche Blaise Pascal, Fondation Ecole Normale Supérieure, Region Ile

de France, Paris, France (October 2005–October 2006). The technical assistance of Hector Rojas, Margarita Bisio, Carlos Rodrigues, and Imeria Nuñez Odreman is gratefully acknowledged.

**Supporting Information Available:** Additional experimental and theoretical details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

- (1) W. H. O. Control of Chagas Disease. *Tech. Rep. Ser.* **2002**, 905, 1–109.
- (2) Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Little, W. C. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* **2000**, 23, 883–889.
- (3) Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **2003**, 19, 495–501.
- (4) Molina, J.; Martins-Filho, O.; Brener, Z.; Romanha, A. J.; Loeberberg, D.; Urbina, J. A. Activity of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) Against Drug-Resistant Strains of the Protozoan Parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 150–155.
- (5) Urbina, J. A.; Payares, G.; Contreras, L. M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M. M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Loeberberg, D. Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 1771–1777.
- (6) Urbina, J. A.; Payares, G.; Molina, J.; Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazard, K.; Piras, M. M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Ryley, J. F. Cure of Short- and Long-Term Experimental Chagas Disease using D0870. *Science* **1996**, 273, 969–971.
- (7) Mason, J. W. Amiodarone. *N. Engl. J. Med.* **1987**, 316, 455–466.
- (8) Courchesne, W. E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 300, 195–199.
- (9) Courchesne, W. E.; Ozturk, S. Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **2003**, 47, 223–234.
- (10) Gupta, S. S.; Ton, V.-K.; Beaudry, V.; Rulli, S.; Cunningham, K.; Rao, R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 28831–28839.
- (11) Afeltra, J.; Vitale, R. G.; Mouton, J. W.; Verweij, P. E. Potent Synergistic In Vitro Interaction between Nonantimicrobial Membrane-Active Compounds and Itraconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus fumigatus* Resistant to Itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1335–1343.
- (12) de Maio, A.; Urbina, J. A. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: terminal oxidases in exponential and stationary growth phase epimastigotes cultured in vitro. *Acta. Cient. Venez.* **1984**, 35, 136–141.
- (13) Hudson, L.; Grover, F.; Gutteridge, W. E.; Klein, R. A.; Peters, W.; Neal, R. A.; Miles, M. A.; Scott, M. T.; Nourish, R.; Ager, B. P. Suggested guidelines for work with live *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1983**, 77, 416–419.
- (14) Hallander, H. O.; Dornbush, K.; Gezelius, L.; Jacobson, K.; Karlsson, I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporin with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 22, 743–752.
- (15) Benaim, G.; Bermudez, R.; Urbina, J. A.  $\text{Ca}^{2+}$  transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, 39, 61–68.

- (16) Mendoza, M.; Mijares, A.; Rojas, H.; Colina, C.; Cervino, V.; DiPolo, R.; Benaim, G. Evaluation of the presence of a thapsigargin-sensitive calcium store in trypanosomatids using *Trypanosoma evansi* as a model. *J. Parasitol.* **2004**, *90*, 1181–1183.
- (17) Colina, C.; Flores, A.; Rojas, H.; Acosta, A.; Castillo, C.; Garrido Mdel, R.; Israel, A.; DiPolo, R.; Benaim, G. Ceramide increase cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in Jurkat T cells by liberation of calcium from intracellular stores and activation of a store-operated calcium channel. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *436*, 333–345.
- (18) Nicholls, D. G.; Ward, M. W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 166–174.
- (19) Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Rangel, S.; Visbal, G.; Lira, R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *125*, 35–45.
- (20) Montalvetti, A.; Bailey, B. N.; Martin, M. B.; Severin, G. W.; Oldfield, E.; Docampo, R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33930–33937.
- (21) Schijman, A. G.; Vigliano, C.; Burgos, J.; Favaloro, R.; Perrone, S.; Laguens, R.; Levin, M. J. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J. Heart Lung Transplant.* **2000**, *19*, 1114–1117.
- (22) Lenhart, A.; Reinert, D. J.; Aebi, J. D.; Dehmlow, H.; Morand, O. H.; Schulz, G. E. Binding structures and potencies of oxidosqualene cyclase inhibitors with the homologous squalene-hopene cyclase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2083–2092.
- (23) Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D'Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* **2004**, *432*, 118–122.
- (24) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (25) Krajewska-Kulak, E.; Niczyporuk, W. Effects of the combination of ketoconazole and calcium channel antagonists against *Candida albicans* in vitro. *Arzneim. Forsch.* **1993**, *43*, 782–783.
- (26) Moebius, F. F.; Reiter, R. J.; Bermoser, K.; Glossmann, H.; Cho, S. Y.; Paik, Y. K. Pharmacological analysis of sterol delta8-delta7 isomerase proteins with [3H]ifenprodil. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 591–598.
- (27) Munayyer, H. K.; Mann, P. A.; Chau, A. S.; Yarosh-Tomaine, T.; Greene, J. R.; Hare, R. S.; Heimark, L.; Palermo, R. E.; Loebenberg, D.; McNicholas, P. M. Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14alpha-demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3690–3696.
- (28) Hinshaw, J. C.; Suh, D. Y.; Garnier, P.; Buckner, F. S.; Eastman, R. T.; Matsuda, S. P.; Joubert, B. M.; Coppens, I.; Joiner, K. A.; Merali, S.; Nash, T. E.; Prestwich, G. D. Oxidosqualene cyclase inhibitors as antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4240–4243.
- (29) Sansone, A.; Courtney, R.; L., M.; Calzetta, A.; Soni, P.; Joseph, D.; Zhang, M.; Laughlin, M. Posaconazole Has No Clinically Significant Effect on QTc Interval in Healthy Volunteers. Presented at the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAC), Washington, DC, Oct 30–Nov 2, 2004, Poster A1100.
- (30) Courtney, R.; Pai, S.; Laughlin, M.; Lim, J.; Batra, V. Pharmacokinetics, safety and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2788–2795.
- (31) Lazard, K.; Urbina, J. A.; DeSouza, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2097–2105.
- (32) Lazard, K.; Urbina, J. A.; DeSouza, W. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis triazole with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 736–740.

JM050691F